

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



**INTERACCIONES NEUROQUÍMICAS Y
COMPORTAMENTALES ENTRE 3,4-
METILENODIOSIMETANFETAMINA (MDMA) Y
ETANOL: IMPLICACIÓN EN LA
NEUROTOXICIDAD DE MDMA Y EN EL
CONSUMO DE ETANOL EN ROEDORES.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Izco Gaviria

Bajo la dirección de la doctora

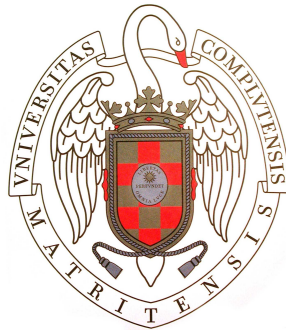
M^a Isabel Colado Megía

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9259-1

© María Izco Gaviria, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
FARMACOLOGÍA



Interacciones neuroquímicas y comportamentales entre
3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) y etanol:
Implicación en la neurotoxicidad de MDMA y en
el consumo de etanol en roedores.

TESIS DOCTORAL

María Izco Gaviria

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Directora :

Dra. M^a Isabel Colado Megía

Profesora Titular
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina

María Izco Gaviria

Madrid, 2008

*A mis Padres y Hermana...
por ser como sois y confiar siempre en mí!*

A Oscar, por tantas cosas...

Agradecimientos

Fue hace ya mucho tiempo cuando pise por primera vez esta Facultad. Mi primer sentimiento fue quizás algo de miedo, pero a la vez de ilusión por empezar lo que siempre había soñado! Cuatro años después, esta Facultad, y en concreto, este laboratorio, ha sido mi casa, sus paredes han vivido demasiados momentos, imborrables! Han sido muchas las personas que de una forma u otra han contribuido con su granito de arena, con su cariño y su apoyo constante, a que esta Tesis Doctoral llegue a su fin. A todas ellas, GRACIAS!

He de agradecer en primer lugar a mi directora de tesis, la Dra. M^a Isabel Colado, por acogerme en su grupo y brindarme la oportunidad de asomarme al mundo de la Ciencia, por la confianza que puso en mí, porque gracias a su brillante carrera investigadora debo mi formación académica y profesional. También quiero dar las GRACIAS de forma especial a la Dra. Esther O'Shea, por tu gran ayuda prestada, tus consejos y tu constante disponibilidad en cualquier momento. Por cuidarnos como a tus propias hijas!

Al Dr. Pedro Lorenzo y al Dr. Ignacio Lisozaín, antiguo y actual directores del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM, por acogerme en este departamento y por estar siempre atento al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A M^a Elena e Isabel, por ayudarme a solucionar los problemas de la burocracia académica y por la excelente labor administrativa que desempeñan. Agradecerles su simpatía.

A Fer, M^a Luisa y Manolo, por el esfuerzo diario para que todo estuviese preparado al comenzar los experimentos. Por no perder nunca el buen humor! Al personal del animalario, en especial a la Dra. Pilar Bringas, a Susana, Fernando, David y Carmen, que siempre han hecho lo posible para que estuviesen disponibles todos los animalitos... que han sido la parte insustituible de esta Tesis. Y al personal de la limpieza, por su simpatía.

Al Plan Nacional Sobre Drogas, al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Ministerio de Sanidad y Consumo, por haber contribuido a la financiación de este proyecto. A la Universidad Complutense de Madrid y a la Comunidad de Madrid, por haber financiado con sus becas de investigación la realización de esta Tesis Doctoral.

Como no, muchas gracias a toda mi gentuilla del laboratorio, por ser lo mejor que me he podido encontrar y por todos los momentos fáciles y difíciles que hemos compartido durante estos años entre estas cuatro paredes. Todo lo que diga, es poco; aún así, lo intentaré. A Inesón, que me ha acompañado desde el primer día que pisé este laboratorio. Nunca he conocido a una persona tan... increíble! Gracias por tanto... por ser como eres, por hacerme reír, por esas largas charlas, por tu confianza, por estar siempre a mi lado, ayudándome, aconsejándome... por ser mi apoyo en Madrid. Como te voy a echar de menos, criaturito! Y a esos movimientos de cadera... A Noemí, la mujer "burullo", por tus besos y por alegrarme con tus innumerables historias. Ahora te toca a ti seguir con el etanol, así que ánimo que seguro que lo haces genial! A Elisilla. Cierta día dijiste: "Estas ... , aunque parezca que no, apoyan un montón"; hoy me toca a mí decirte "gracias"... por todo lo que me has ayudado, por ser la mejor compi de mesa que se puede tener (como los auténticos "viejos del palco" de los teleñecos) y sobre todo, por todos los buenos momentos que me has hecho pasar cuando los necesitaba. Esto no hubiera sido lo mismo sin tus chillos!! No sabes lo que los voy a echar de menos! Y ya no digo más porque cuando estas arpias lo lean... se van a morir de la envidia, porque ya sabes tu que "si la envidia fuese tiña..." Y esa bebida que llevas dentro... que me va a echar de menos después de tanto oírme ahí cerquita! A Andreilla, la pequeña del grupo, con ese lenguaje zamorano... la que pone algo de coherencia en el grupo. Desde el primer día que te "he visto", "he pensado" (jio, lo que cuesta hablar así!) que ibas a ser un buen fichaje! Y no me he equivocado! Gracias por tu gran apoyo, por los buenos momentos, por los caminos a casa rajando y rajando después de inglés y sobre todo, por la confianza que me has dado! No cambies nunca, porque vales un montón! Acuérdate de mí cuando haya alguna de esas ferias de ropa que tanto nos gustan!! A Loloí, por tu alegría, por todos los buenos momentos que me has hecho pasar y sobre todo, por tu sabiduría, tu gran ayuda y constante disponibilidad. Y por esa música clásica que amansa a las fieras... y por cuidarnos como a tus hijos!! A Vanesilla, nuestra diseñadora

personal, a sido poquito el tiempo, pero como si hubiera sido una eternidad! Al final te convertirás en una auténtica matarratas, verdad “tronca”? Voy a echar de menos ese acento tan madrileño... Y no te olvides de ir enseñándome tus nuevas colecciones, eh? Y a Deivid, nuestro último fichaje, que ha vivido los últimos y más estresantes coletazos de esta Tesis. Por alegrarme con tus mil y una canciones en cada ocasión, por no perder la sonrisa ni el buen humor y por tus preguntas existenciales que nos haces plantearnos todo... No te quejarás de cómo te cuidamos, eh? Que te tenemos todo mimadito entre tanta mujer! Veis como al final el laboratorio no está tan gafado?? Porque este laboratorio ha hecho que nos juntemos, y para mí eso vale demasiado!

Y a todas aquellas personas que abandonaron el grupo. A Ivanny, gracias por esos dos añitos, por las largas charlas en la gallina, por tu cariño y por hacerme sentir como en casa. A ti te debo gran parte de esta Tesis! A Iñaki, el gran desertor, por todos los momentos tan buenos que hemos pasado, inolvidables! Tus rancias te han echado de menos! A Chabu, gracias por tu ayuda, por todo el tiempo dedicado a enseñarme, a solucionar dudas, por no perder nunca la calma ni la sonrisa!. A Sergy, por toda tu ayuda, por tus ánimos, besos y por tu confianza. Ha sido poquito el tiempo que has pasado en el laboratorio, pero suficiente para no olvidarte nunca!

Todos, lo habéis hecho chapó. Sin duda, vosotros me habéis enseñado más de mí y de la vida que lo que se puede aprender en cualquier Tesis. Habéis sido mi gran family en Madrid. Ojalá estaría siempre trabajando con vosotros, porque sois todos increíbles. Y solo una cosita más! Aunque me haya quejado tanto de la gran capital, deciros (y solo lo diré esta vez, eh?) que MADRID se ha llevado un trocito de mi corazón, porque Madrid tiene un encanto especial, pero sobre todo, gente increíble!

A todas aquellas personas ajenas al laboratorio, que han estado ahí cada día. En especial, a Janas! Primero Logroño, siguió Zaragoza, después Madrid, y ahora... se me va a hacer muy duro no tenerte cerca. Gracias por escucharme, ayudarme, animarme, estar siempre a mi lado, sobre todo en los malos momentos, por ser mi gran amiga y compartir muchos momentos a lo largo de estos años. A Ana Carol, mi psicóloga favorita, gracias por tus ánimos y por estar ahí siempre que lo he necesitado. Ánimo niña, algún día recogeremos nuestros frutos! Tú ya los has recogido... te lo mereces! A la Mila, gracias por ese primer año que pasamos en nuestro pisito, por estar ahí y por todos los buenos momentos que compartimos. A Marymos, por sus ánimos y cariños. Mary, prometo no irme de Madrid sin ver tu hogarcito! A Jose, por esas cañitas... por tu apoyo y por todos esos ratos tan buenos que me has hecho pasar. Por fin terminó la tortura de Madrid, jejeje!!! Ahora a ver que nos depara. Animo! que ya no te queda nada a ti tampoco. A Nuri, gracias por esos dos añitos viviendo contigo, me cuidaste muy bien! A Carlitos, porque a pesar de ser un “tocahuevos”... es un chico estupendo! Cuida mucho de mi Inesita, eh? Y a ver cuando hay boda! A Rafa, por cuidarnos tan bien, como a tus hijas... y por tu buen humor! Y tú a cuidar mucho a mi Elisilla, eh? Y a Juanjo, por toda la alegría que derramas!

Y todas aquellas que desde Logroño han estado ahí, animándome. En especial, a mi hermana, Laura, por ser mi mejor amiga y quererme tanto!! Te he echado tanto de menos en Madrid, sin esas charlas y cotilleos antes de dormir! Y ahora ya te has ido a tu casita...A mi cuñi, Oscar, por estar ahí también cada fin de semana y por tu interés por cómo va todo. A Mir, por tu constante apoyo y por tus múltiples ánimos. Gracias por estar ahí siempre! Espero la fiesta de bienvenida, eh? A la Helen, que se alegrará de que por fin termine la tesis. Gracias por tus consejos! A Miguel, por los innumerables viajes de los Domingos y por todos tus sabios consejos. Y a todas aquellas persona que aunque no están aquí, me han apoyado.

En especial, quiero dedicar esta Tesis a mis padres y hermana; sin vuestro cariño, vuestro amor, vuestro apoyo y vuestro constante sacrificio nunca hubiera podido llegar tan alto. Sin vosotros no hubiera resistido. Ha sido largo el camino,

duro en la distancia, pero por fin lo he conseguido. De vosotros he aprendido que todo lo que se quiere, hay que luchar por conseguirlo! Y aquí está! Espero que estéis orgullosos de mí, yo lo estoy de vosotros. Así que muchas gracias, family!!! por ser como sois, por haber confiado siempre en mí y por ser la mejor familia que se puede tener. Os quiero mucho.

A mi abuela, tíos, primos, por estar conmigo siempre que los necesito y apoyarme.

Y por supuesto, a mi niño, Oscar, por tantas, tantas y tantas cosas... Por hacer que te sienta tan cerca a pesar de la distancia, por estar cada día a mi lado, apoyándome, sobre todo animándome a seguir, queriéndome, haciéndome reír cuando estoy triste, por ser una parte muy importante de mi vida, por caminar junto a mí y descubrir conmigo lo mejor de la vida. Por fin he llegado a la meta, gracias a ti. Gracias por quererme tanto... porque no podría ser más feliz!!! TE QUIERO, cosita.

Abreviaturas

ACh , acetilcolina	MDA , 3,4-metilenodioxianfetamina
ADH , alcohol deshidrogenasa	MEOS , sistema de oxidación microsomal
ADN , ácido desoxiribonucleico	mg , miligramos
ALDH , aldehído deshidrogenasa	mg/dL , miligramos por decilitro
AMPT , α -metil-p-tirosina	mg/kg , miligramos por kilogramo
ANOVA , análisis de varianza	min , minutos
ARNm , ácido ribonucleico mensajero	mL , mililitros
ATP , adenosín trifosfato	mL/kg , mililitros por kilogramo
ATV , área tegmental ventral	mm , milímetros
B_{max} , densidad de lugares de recaptación	mM , milimolar
Cian , cianamida	mL/min , mililitros por minuto
cm , centímetros	NA , noradrenalina
col. , colaboradores	NMDA , N-metil-D-aspartato
CYP2E1 , citocromo P-450 isoenzima 2E1	ng , nanogramos
DA , dopamina	nm , nanómetros
DAT , transportador de dopamina	NO , óxido nítrico
2,3-DHBA , ácido 2,3-dihidroxi benzoico	NOS , óxido nítrico sintasa
2,5-DHBA , ácido 2,5-dihidroxi benzoico	nNOS , óxido nítrico sintasa neuronal
5,7-DHT , 5,7-dihidroxitriptamina	n.s. , no significativo
DHPG , dihidroxifenilglicol	°C , grado centígrado
DMSO , dimetilsulfóxido	OMS , Organización Mundial de la Salud
DNPH , 2,4-dinitrofenilhidracina	P , probabilidad
DOPAC , ácido 3,4-dihidroxifenilacético	PBN , di-fenil-N-tert-butil-nitrona
EROs , especies reactivas de oxígeno	PET , Tomografía de Emisión de Positrones
G , gramos	pg , picogramos
GABA , ácido γ -aminobutírico	PKC , proteína quinasa C
GMPC , guanidín monofosfato cíclico	p/v , peso/volumen
h , horas	RM , Resonancia Magnética
HHMA , 3,4-dihidroximetanfetamina	s , segundo
HMA , hidroxi-3-metoxi-anfetamina	s.c. , subcutáneo
5-HIAA , ácido 5-hidroxiindolacético	SERT , transportador de serotonina
h.p.l.c. , cromatografía líquida alta resolución	SNC , sistema nervioso central
5-HT , 5-hidroxitriptamina; serotonina	SOD , superóxido dismutasa
HVA , ácido homovanílico	TAC , tomografía axial computarizada
i.c.v. , intracerebroventricular	TH , tirosina hidroxilasa
i.p. , intraperitoneal	TPH , triptófano hidroxilasa
K_D , constante de disociación	UCM , Universidad Complutense de Madrid
l , litros	V , voltios
l/h , litro por hora	V_{max} , velocidad máxima
LCR , líquido cefalorraquídeo	v/v , volumen/volumen
M , molaridad	μA , microamperios
MAO , monoamino oxidasa	μl , microlitros
MDMA , 3,4-metilenodioximetanfetamina	μM , micromolar

%, *porcentaje*

[³H], *tritio*

ÍNDICE

I. Introducción	1
Sección 1: 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA)	1
1. MDMA	1
1.1. Aspectos generales.	1
1.2. Estructura química de la MDMA.	1
1.3. Historia y situación actual de la MDMA.	2
1.4. Presentación y adulteración de la MDMA.	4
1.5. Consumo de éxtasis: contexto social y policonsumo.	5
2. Efectos de la MDMA en animales de experimentación	6
2.1. RATA	6
2.1.A. Efectos agudos.	6
2.1.B. Efectos a largo plazo.	20
2.2. RATÓN	25
2.2.A. Efectos agudos	25
2.2.B. Efectos a largo plazo.	29
2.3. NEONATOS.	31
2.4. PRIMATES NO HUMANOS.	32
3. Efectos de la MDMA en humanos	33
3.1. Efectos agudos.	34
3.1.A. Efectos psicológicos.	34
3.1.B. Efectos fisiológicos.	35
3.2. Efectos a largo plazo.	36
3.2.A. Efectos psicológicos y cognitivos.	36
3.2.B. Efectos fisiológicos.	36
3.2.C. Efectos neurotóxicos.	36
4. Mecanismos de neurotoxicidad de la MDMA.	38
4.1. Implicación de la hipertermia.	38
4.2. Implicación del estrés oxidativo y los radicales libres de oxígeno.	39
4.3. Implicación de 5-HT, sus metabolitos y el sistema de transporte de 5-HT.	40
4.4. Implicación del sistema de DA.	40
4.5. Implicación de un metabolito tóxico de la MDMA.	42
4.6. Implicación del glutamato y del óxido nítrico.	43
4.7. Implicación del equilibrio energético.	44
Sección 2: Etanol.	46
5. ETANOL.	46
5.1. Aspectos generales.	46
5.2. Estructura química del etanol.	46
5.3. Definición y clasificación de las bebidas alcohólicas.	47
5.4. Historia y situación actual del consumo de alcohol.	47
6. Metabolismo del etanol.	50
6.1. Metabolismo periférico del etanol.	50
6.2. Metabolismo central del etanol.	51
7. Neurobiología de la adicción al alcohol.	53
7.1. Tolerancia al alcohol.	53
7.2. Dependencia al alcohol.	53

7.3. Mecanismos de la adicción.	54
8. Efectos del etanol en animales de experimentación.	55
8.1. Efecto sobre el sistema glutamatérgico.	55
8.2. Efecto sobre el sistema gabérgico.	57
8.3. Efecto sobre el sistema dopaminérgico.	58
8.4. Efecto sobre el sistema serotoninérgico.	60
8.5. Efecto sobre el sistema opioide.	61
8.6. Efecto sobre la formación de radicales libres y estrés oxidativo.	62
8.7. Efecto sobre la temperatura rectal.	63
9. Efectos del etanol en humanos.	64
9.1. Intoxicación aguda.	65
9.1.1. <i>Efectos psicológicos y fisiológicos.</i>	65
9.2. Efectos crónicos.	66
9.2.1. <i>Efectos psicológicos y fisiológicos.</i>	66
9.2.2. <i>Efectos neurotóxicos.</i>	66
10. Mecanismos implicados en la neurotoxicidad inducida por etanol.	68
10.1. Implicación del sistema glutamatérgico: receptor NMDA y Ca^{2+} intracelular.	68
10.2. Implicación del acetaldehído.	70
10.3. Implicación del estrés oxidativo.	71
II. Hipótesis y Objetivos.	73
III. Material y Métodos.	77
1. Animales utilizados.	77
2. Diseño experimental.	77
3. Determinación de la concentración de etanol en plasma.	85
4. Determinación de los niveles plasmáticos de acetaldehído.	86
5. Medición de la temperatura rectal.	87
6. Determinación de parámetros neuroquímicos en tejido cerebral.	87
6.1. Determinación de niveles cerebrales de monoaminas y metabolitos.	87
6.1.1. <i>Extracción y preparación de muestras.</i>	87
6.1.2. <i>Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos.</i>	87
6.2. Determinación de lugares de recaptación de 5-HT marcados con [^3H]-paroxetina.	88
6.2.1. <i>Extracción y purificación de las muestras.</i>	89
6.2.2. <i>Fijación de [^3H]-paroxetina</i>	89
6.2.3. <i>Determinación de la concentración proteica.</i>	89
6.3. Determinación de lugares de recaptación de DA marcados con [^3H]-WIN 35,428.	90
6.3.1. <i>Extracción y purificación de las muestras.</i>	90
6.3.2. <i>Fijación de [^3H]-WIN 35,428.</i>	90
7. Microdiálisis intracerebral “in vivo”.	91
7.1. Análisis cuantitativo de DA en el dializado estratial.	91
7.1.1. <i>Anestesia e implantación de la cánula guía.</i>	91
7.1.2. <i>Microdiálisis</i>	92
7.1.3. <i>Cuantificación de la concentración de DA.</i>	92
7.2. Determinación de radicales hidroxilo en el dializado hipocampal.	93
7.2.1. <i>Anestesia e implantación de la cánula guía.</i>	94
7.2.2. <i>Microdiálisis</i>	94
7.2.3. <i>Cuantificación de la concentración de 2,3-DHBA.</i>	94

8. Autorradiografía cuantitativa de receptores D ₁ y D ₂	95
9. Herramientas farmacológicas. Características y procedencia.	95
10. Otros reactivos químicos.....	96
11. Tratamiento estadístico de los datos.....	97
IV. Resultados	99
Estudio 1: Efecto del efecto de la pre-exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma sobre la lesión serotoninérgica inducida por MDMA en el cerebro de la rata.....	99
1.1. Optimización del método de administración de etanol a la rata mediante cámaras de inhalación.....	99
1.2. Efecto de la exposición intermitente a etanol sobre la hipertermia y la neurotoxicidad inducida por MDMA.....	101
1.3. Implicación de los radicales libres en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.	108
1.4. Implicación del acetaldehído en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.....	110
Estudio 2: Efecto producido por la lesión dopaminérgica inducida por MDMA en el cerebro del ratón sobre el consumo y la preferencia por etanol.....	115
2.1. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre el consumo y la preferencia por etanol.....	115
2.2. Efecto de agonistas y antagonistas D ₁ sobre el consumo y la preferencia por etanol en ratones pre-expuestos a una dosis neurotóxica de MDMA.	121
2.3. Efecto de la MDMA sobre la liberación de dopamina inducida por etanol en el núcleo accumbens..	123
2.4. Efecto de la MDMA sobre la densidad de los receptores de dopamina D ₁ y D ₂ en el núcleo accumbens y caudado-putamen.	125
2.5. Consumo de sacarosa y quinina por ratones pre-tratados con una dosis neurotóxica de MDMA.	127
2.6. Efecto de la MDMA sobre la actividad locomotora inducida por etanol.	131
2.7. Efecto de la MDMA sobre el nivel de ansiedad.....	133
2.8. Efecto de la MDMA sobre la sensibilidad al efecto hipnótico-sedante del etanol.....	135
2.9. Efecto de la MDMA sobre la tolerancia a la hipotermia inducida por etanol.	137
2.10. Efecto de la MDMA sobre los niveles de etanol en plasma.	139
2.11. Efecto de la MDMA sobre la concentración de DA y la densidad de los lugares de recaptación de dopamina (DAT).....	141
V. Discusión	143
VI. Conclusiones	153
VII. Bibliografía.....	155

I. Introducción

Sección 1: 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA).

1. MDMA

1.1. Aspectos generales.

La 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, más conocida vulgarmente como “éxtasis”) es un derivado anfetamínico perteneciente al grupo de las denominadas “drogas de síntesis” o “drogas de diseño”. Bajo este epígrafe se agrupa un conjunto de nuevas drogas de abuso con acción psicoactiva, diseñadas y fabricadas fácilmente por químicos clandestinos.

Actualmente conocida en todo el mundo como XTC o éxtasis, la MDMA también se distribuye bajo las siguientes denominaciones: Essence, M&M, Euphoria o Adam en EE.UU.; Tacha en México; E, en Reino Unido. En España adquiere una gran variedad de nombres, dependiendo del logotipo que aparece en una de las caras de las pastillas: pastillas, pastis, pirulas, pajarito, delfín, sol, tulipán, simpson, estrella...

1.2. Estructura química de la MDMA.

Químicamente, la MDMA posee varios sinónimos: 3,4-metilenodioximetanfetamina, N- α -metil-3,4-metilenodioxianfetamina, N- α -dimetil-3,4-metilendioxifenetilamina, 2-metilamina-1-(3,4-metilendioxifenil)-propano, N- α -dimetil-homopiperonilamina, N-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-aminopropano, N- α -dimetil- β -(3,4-metilendioxifenil)-etilamina y N- α -dimetilbenzodioxol-5-etilamina, siendo su fórmula empírica $C_{11}H_{13}NO_2$ y su estructura molecular y tridimensional la que se representa en la figura 1.

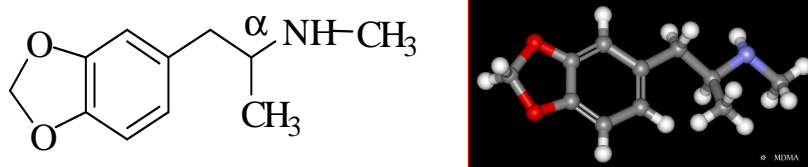


Figura 1. Estructura molecular y tridimensional de la MDMA.

Como se ve en su fórmula química, la MDMA es un derivado de la feniletilamina, relacionado estructuralmente con la *anfetamina* y con el compuesto alucinógeno *mescalina* (figura 2). Comparte con aquella la acción estimulante pero, sin embargo, no posee actividad alucinógena como ésta última, debido a la presencia de un radical metilo en el grupo amino, que confiere a la molécula una estructura de amina secundaria y no primaria como es el caso de la mescalina y otros derivados anfetamínicos alucinógenos (Peroutka, 1990).

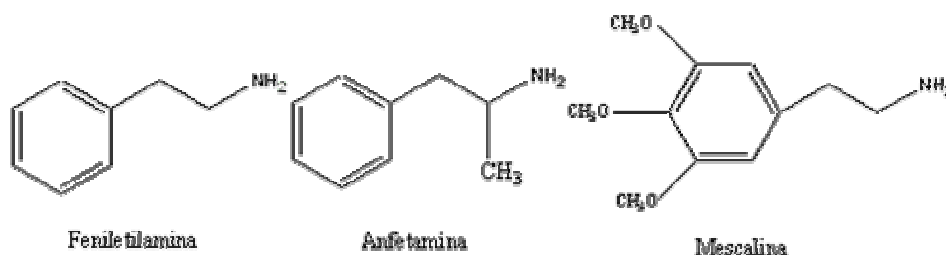


Figura 2. Estructura química de la feniletilamina, anfetamina y mescalina.

La MDMA posee un carbono quiral, carbono α , que le confiere la existencia de dos isómeros ópticos, S-(+)-dextro- y R-(-)-levorrotatorio, siendo el (+) MDMA el que ejerce mayor actividad sobre el sistema nervioso central (SNC). Se ha observado que el isómero dextro posee una mayor capacidad para estimular la liberación de monoaminas (Johnson y *col.* 1988; Schmidt y *col.* 1987) y una potencia todavía mayor para producir neurotoxicidad a largo plazo (Schmidt, 1987b), a diferencia de las anfetaminas con propiedades alucinógenas, como MDA y DOM, cuyo isómero activo es el *levo* (Prada y Alvarez, 1996).

1.3. Historia y situación actual de la MDMA.

El primer documento público referente a la MDMA data de 1912, año en el que la empresa farmacéutica E. Merck la aisló accidentalmente, patentándola en 1914 como producto intermedio en la síntesis de otras sustancias, sin ninguna utilidad por sí misma.

Tras la patente de Merck, no hay apenas datos escritos sobre MDMA y hay que saltar a 1953 para encontrar la siguiente pista. En este año, el ejército estadounidense contrató a la Universidad de Michigan para llevar a cabo algunos ensayos toxicológicos en animales de experimentación. Pero hasta 1973 no se publicaron los primeros datos biológicos sobre esta droga, donde se establecía la dosis letal DL_{50} de la MDMA en diferentes especies animales.

El redescubridor y principal protagonista de la historia moderna de la MDMA es el químico y toxicólogo Alexander Shulgin, quien volvió a sintetizar la MDMA en 1965 y comenzó a investigar dicha droga junto a su mujer. Los modelos animales aportan muy poca información sobre los efectos de esta sustancia en la mente humana, así que los Shulgin optaron por experimentar de primera mano los efectos de la MDMA. El primer informe sobre la capacidad psicoactiva de la droga en humanos data de 1978 (Shulgin y Nichols, 1978) y en él se describe el efecto que produce la MDMA como “un estado alterado de la conciencia fácilmente controlable con connotaciones emocionales y sensuales”, lo que hace que el mismo Shulgin sugiera su uso como herramienta en psicoterapia. Así, entre 1977 y 1984 se fue tejiendo una red de profesionales con experiencia y acceso a la MDMA,

que era utilizada como herramienta para psicoterapia, gracias a su capacidad para facilitar la empatía y la comunicación verbal de los pacientes (Greer y Strassman, 1985).

Sin embargo, en los años ochenta, la MDMA comienza a ser utilizada con fines recreativos en EE.UU.; al principio, la MDMA se perfilaba como “la droga de elección para aquellos que se identificaban con el movimiento *New Age*” y su expansión fue considerable entre los herederos del movimiento *hippie*, estudiosos del misticismo oriental... Después fue ampliándose hasta llegar a popularizarse, asociada al ocio nocturno y a la música electrónica (Bobes y col., 2002).

De manera paralela a su popularización, en julio de 1985 la “*Drug Enforcement Administration*” (DEA) incluyó a la MDMA en la lista I de sustancias controladas (“*Controlled Substances Act*”, CSA) debido a su alto potencial como droga de abuso, su falta de aplicación clínica y el incumplimiento de las normas de seguridad exigidas por la “*Food and Drug Administration*” (FDA), de tal forma que así quedó definitivamente ilegalizada.

El argumento de mayor peso utilizado para incluirla en esta lista fue un estudio que mostraba que la 3,4-metilenodioxianfetamina, MDA, principal metabolito de la MDMA, produce daño en los terminales serotoninérgicos del cerebro de rata (Ricaurte y col., 1985). Esta inclusión provocó una gran polémica entre todos aquellos profesionales que defendían su utilización en psicoterapia (Greer y Strassman, 1985).

España también se sumó a estas medidas de ilegalización del éxtasis, mediante la orden ministerial del 30 de Mayo de 1986. El Convenio de Viena incluyó la MDMA en la lista I de Psicotrópicos el 21 de Febrero de 1971. Actualmente, el Código Penal Español penaliza elaborar, traficar y promover el consumo de esta sustancia, considerándolo un delito sobre la salud pública.

Hoy, la Sociedad Multidisciplinar de Estudios Psicodélicos (MAPS, www.maps.org), continúa reivindicando su uso terapéutico y tiene en marcha un estudio clínico dirigido a evaluar la MDMA como fármaco de prescripción médica para el tratamiento del trastorno por estrés postraumático (TEPT), que se está llevando a cabo en EE.UU., Israel y España (Doblin, 2002). En nuestro país, se concedió el permiso en el año 2000 para evaluar la eficacia de una única dosis de MDMA administrada a mujeres que sufrían TEPT. Sin embargo, coincidiendo con el fallecimiento de dos jóvenes por el consumo de esta droga y la aparición de un reportaje sobre este estudio (*El País*, 2002), el gerente del Hospital Psiquiátrico de Madrid retiró el permiso para que el estudio continuara, tal vez motivado por “presiones desde arriba” (Bouso y Gomez-Jarabo, 2003). En EE.UU. e Israel continúan con el estudio, y en el año 2006 comenzó el ensayo con MDMA para determinar su uso como tratamiento psicoterapéutico de la depresión de pacientes con cáncer en EE.UU.

1.4. Presentación y adulteración de la MDMA.

En su forma pura, la MDMA se presenta como un polvo blanco muy poco soluble en agua, mientras que en forma de sal es un polvo blanco cristalino con sabor amargo y muy soluble en agua. En la calle suele distribuirse en forma de clorhidrato y mezclada con otras sustancias de soporte o psicoactivas. Se presenta en diferentes formas farmacéuticas, siendo más habitual la forma de comprimidos (conocidos coloquialmente como *pastillas*, *pastis*, *pirulas*). Existe una amplia gama de formas, colores y texturas de los comprimidos, con diversos troquelados, que le confieren los distintos nombres en el argot popular (figura 3).

Los colores que predominan son el blanco, crema, hueso o rosa, aunque dependiendo del resto de compuestos que incluyan, pueden encontrarse en colores tan dispares como verde, rojo burdeos, marrón, etc (Figura 3). El tamaño más habitual de un comprimido de éxtasis de 250-300 mg de peso oscila entre 8-10 mm de ancho y 3-4 mm de largo. La forma suele ser redondeada, aunque también presentan formas ovaladas, triangulares o planas.



Figura 3: Diferentes presentaciones de comprimidos de éxtasis en el mercado ilegal.

La cantidad de principio activo presente en comprimidos, de aproximadamente 300 mg, oscila entre 90 y 166 mg, según el Instituto Nacional de Toxicología (INT), lo que indica que las pastillas de éxtasis se encuentran adulteradas con otras sustancias, y que el consumidor rara vez sabe la cantidad que toma en realidad. El éxtasis suele adulterarse con benzodiacepinas, antihistamínicos, cafeína, efedrina, resina de *Cannabis sativa*, ketamina, etc, y también pueden contener una gran variedad de impurezas procedentes del método de síntesis, de la materia prima empleada o debido a una mala purificación del producto final.

En el mercado ilegal, el precio medio de los comprimidos de éxtasis oscila entre los 6 y los 18 € (Gamella y Roldán, 1997; Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD), 2002), lo que hace que sea una droga asequible para adolescentes y estudiantes.

1.5. Consumo de éxtasis: contexto social y policonsumo.

El consumo de MDMA se ha ido introduciendo poco a poco en diferentes ambientes musicales. Comienza acompañando a la música *house*, más tarde al *techno*, para seguir uniéndose a otros estilos musicales que van apareciendo, como el *trance* o *progressive*. El consumo de MDMA comenzó así a vincularse con las llamadas “*raves*”, fiestas multitudinarias realizadas en espacios cerrados donde los “*ravers*” bailan estáticamente al ritmo tecno, usando psicodélicos visuales y música que doblegue la mente.

Tras propagarse el uso de esta droga, el Parlamento Británico prohibió las “*raves*”, contribuyendo a hacerlas más populares. De los bares se desplazaron a almacenes vacíos y campos abiertos, donde todavía hoy siguen celebrándose. Así, durante la década de los 90, el éxtasis fue la droga que experimentó mayor incremento de consumo, llegando a ser la segunda droga más consumida, después del cánnabis (Gamella y Roldán, 1997).

Actualmente, aproximadamente un 0,2 % de la población mundial de 15 años en adelante consume éxtasis. En España, la mayoría de los usuarios que consumen éxtasis tienen entre 18 y 24 años. Un 66,1 % de los consumidores totales son varones, y la media de edad es ligeramente superior para éstos (23,4 años) que para las mujeres (21,9 años).

1.5.1. Frecuencia y contexto social.

La mayoría de los consumidores de éxtasis son usuarios experimentales u ocasionales, que han consumido esta sustancia con una frecuencia limitada. Sin embargo, hay un porcentaje importante (26 %) que mantienen un uso regular del éxtasis, y son casi un 15 % los que mantienen pautas compulsivas de consumo. Sólo una minoría (6,8 %) usa el éxtasis con una frecuencia a largo plazo que resulta alarmante (PNSD, 2002).

Son muy raros los usuarios de MDMA que consumen esta droga en soledad, siendo muy comunes los usos colectivos, con un propósito social: reunirse o dar una fiesta para consumir esta sustancia. Es también frecuente el consumo en pareja, en un entorno erótico o sexual.

1.5.2. Policonsumo.

El éxtasis es una droga que comenzó a consumirse sola. Sin embargo, actualmente la mayoría de los consumidores de éxtasis usan otras drogas, lícitas o ilícitas, además de la MDMA. La mayoría de los consumidores mezclan las pastillas con otras sustancias psicoactivas, sobre todo el alcohol (98,7 %), tabaco (90,5 %) y cánnabis (86,5 %). Es también frecuente combinar éxtasis con anfetaminas, cocaína o LSD (PNSD, 2003).

Hay que tener en cuenta que el aspecto de droga “limpia y segura” que presentaba la MDMA en sus orígenes, va perdiendo solidez en la medida en que hablamos de policonsumo. Poco se sabe

de la interacción entre drogas, si bien es lógico pensar que el policonsumo aumente el riesgo para la salud.

2. Efectos de la MDMA en animales de experimentación.

Cuando se administra en animales de experimentación, la MDMA produce una respuesta neuroquímica de tipo bifásico: provoca unos efectos inmediatos, que acontecen al poco tiempo de administrar la droga y la mayoría de los cuales revierten en las 24 h siguientes a su administración, y unos efectos a largo plazo, que son persistentes, e incluso en algunas especies animales posiblemente permanentes. Los efectos inmediatos parecen ser los responsables de las acciones sobre el comportamiento que provoca la droga (Marston y col. 1999), mientras que los efectos a largo plazo son considerados neurotóxicos (Ricaurte y col., 1992; Green y col., 2003). Estos efectos a largo plazo varían dependiendo de la especie animal y están condicionados al grado de desarrollo (adulto o neonatal) del animal.

2.1. RATA

2.1.A. Efectos agudos.

2.1.A.1. Efecto sobre el sistema serotoninérgico.

La administración de MDMA en ratas produce una rápida y pronunciada liberación de serotonina (5-HT) al espacio extracelular. Este hecho ha sido ampliamente demostrado tanto *in vivo*, mediante microdiálisis intracerebral (Gough y col., 1991; Yamamoto y col., 1995; Gudelsky y Nash, 1996; Sabol y Seiden, 1998; Shankaran y Gudelsky, 1999; Nixdorf y col., 2001; Mechan y col., 2002a), como *in vitro*, en sinaptosomas y rebanadas cerebrales (Nichols y col., 1982; Johnson y col., 1986; Schmidt y col., 1987; Berger y col., 1992) y en cultivos neuronales (Azmitia y col., 1990; Gu y Azmitia, 1993).

La primera evidencia de la liberación *in vitro* de 5-HT tras la administración de MDMA se obtuvo en rebanadas hipocampales de rata mediante estudios con 5-HT marcada radiactivamente, demostrándose también que esta liberación es dosis-dependiente y que no existen diferencias en la capacidad de liberación entre los dos isómeros de la MDMA (Johnson y col., 1986). Así mismo, Gudelsky y Nash (1996) demostraron *in vivo* que dicha liberación de 5-HT en estriado y corteza es también dependiente de la dosis de MDMA administrada.

La liberación masiva de 5-HT al espacio extracelular provoca una disminución en el contenido de 5-HT y de su principal metabolito, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), en tejido cerebral durante las primeras horas tras la administración de MDMA (Schmidt y col., 1986; Stone y col., 1987a; Logan y col., 1988; McKenna y Peroutka, 1990; Gough y col., 1991; Colado y Green,

1994; Aguirre y col., 1995; Connor y col., 1998). La disminución de 5-HT en hipocampo y corteza llega a ser del 60 % a la hora (Stone y col., 1987) y entre las 3 y 6 h tras la administración de MDMA la reducción del contenido indólico llega a su máximo, un 80 % del contenido inicial (Schmidt y col., 1986; Stone y col., 1987, 1989; Colado y Green, 1994). La recuperación comienza después, de tal manera que a las 18 h de la administración de la droga la reducción del contenido indólico es de un 18 % respecto al inicial (Stone y col., 1986). A las 24 h, los niveles de 5-HT y 5-HIAA se recuperan completamente, alcanzando valores basales (Stone y col., 1987).

La MDMA estimula la liberación de 5-HT del terminal nervioso mediante dos mecanismos: uno calcio-dependiente, por exocitosis (Crespi y col., 1997) y otro independiente de calcio (Johnson y col., 1986), mediante la inversión de la dirección de funcionamiento del transportador de 5-HT (Nichols y col., 1982; McKenna y col., 1991; Berger y col., 1992; Rudnick y Wall, 1992). Así, el vaciamiento de los depósitos vesiculares de 5-HT con reserpina disminuye la liberación de 5-HT inducida por MDMA (Sabol y Seiden, 1998) y el bloqueo del transportador de 5-HT mediante inhibidores selectivos, como fluoxetina, atenúa también el efecto de la MDMA sobre la liberación de 5-HT (Schmidt, 1987b; Schmidt y col., 1987; Azmitia y col., 1990; Gudelsky y Nash, 1996; Mehan y col., 2002). Mlinar y col., (2003) demostraron, mediante el bloqueo del transportador de 5-HT y la inhibición del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2) con tetrabenazina, que ambos transportadores están implicados en dicha liberación de 5-HT.

Además de estimular la liberación de 5-HT, la MDMA es capaz de inhibir la recaptación de 5-HT al interior del terminal y al interior de las vesículas, a través del transportador sináptico (Steele y col., 1987; Johnson y col., 1991) y vesicular (Bogen y col., 2003), respectivamente. También inhibe las enzimas encargadas de su síntesis, la triptófano hidroxilasa (TPH) (Stone y col., 1987a,b; 1988; Schmidt y Taylor, 1987; Johnson y col., 1992; Che y col., 1995) y de su metabolismo, la monoaminooxidasa-A (MAO) (Leonardi y Azmitia, 1994).

2.1.A.2. Efecto sobre la Triptófano Hidroxilasa (TPH) y la Monoamino Oxidasa (MAO).

Está ampliamente demostrado que la MDMA inhibe la actividad de la enzima limitante de la síntesis de 5-HT, la TPH (Stone y col., 1987a; 1988; Schmidt y Taylor, 1988; Johnson y col., 1992; Che y col., 1995). Stone y col. (1987a) demostraron que la actividad de la TPH empieza a disminuir en neocórtex, corteza frontal, hipocampo e hipotálamo a los 15 min tras la administración de una dosis única de MDMA (10 mg/kg), continuando inhibida 2 semanas más tarde (Schmidt y Taylor, 1988). Estudios en nuestro laboratorio han demostrado una inhibición de la enzima que se mantiene hasta 8 semanas tras la administración de una dosis única de MDMA (12,5 mg/kg) (O'Shea y col., 2006). Con dosis múltiples de MDMA, se ha observado una inhibición de la enzima de hasta 110 días (Stone y col., 1987a).

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar este efecto:

La MDMA puede metabolizarse a compuestos con estructura de quinona, los cuales podrían oxidar a los grupos sulfidrilos de la molécula de TPH, inactivándola (Rattray, 1991). Esto concuerda con estudios realizados *ex vivo* en homogenados de tejido cortical de ratas inyectadas con MDMA, donde la actividad de la TPH se recupera 3 h después mediante la incubación del tejido con ditriotreitol o 2-mercaptoetanol (agentes con grupos sulfidrilos) en condiciones anaerobias bajo atmósfera de N₂ (Stone *y col.*, 1989).

También podría ser consecuencia del estrés oxidativo generado por MDMA, ya que fármacos como fluoxetina, que disminuyen la formación de radicales hidroxilo inducida por MDMA (administrado 3 h antes de MDMA 5 mg/kg, *i.p.*), previenen totalmente la inhibición de la enzima. Además, compuestos como el óxido nítrico, el peroxinitrito, los compuestos catecol-quinona y, en general, los radicales libres de oxígeno, son capaces de oxidar covalentemente a proteínas con grupos sulfidrilo (Kuhn y Arthur, 1999).

Parece ser que la generación periférica de un metabolito activo es el responsable de los efectos neuroquímicos agudos inducidos por la MDMA. Así, una inyección única y directa de MDMA en el cerebro de rata no altera la actividad de la TPH en corteza ni estriado, mientras que la infusión *i.c.v.* de MDMA durante 1 h resultó en una significativa reducción de la actividad de la TPH (Schmidt y Taylor, 1988). Además, la MDMA *in vitro* no ejerce un efecto inhibitorio sobre esta enzima (Schmidt y Taylor, 1987).

Se ha implicado a la dopamina (DA) como un mediador parcial de la inhibición de la actividad de la TPH inducida por MDMA, ya que se ha comprobado que el vaciamiento de DA central mediante la administración de α -metil-p-tirosina (AMPT) o reserpina, o mediante la destrucción de las proyecciones dopaminérgicas nigroestriales con 6-hidroxidopamina, atenúa parcialmente dicha inhibición inducida por MDMA (Stone *y col.* 1988).

Existe la posibilidad de que el flujo de calcio esté también implicado en la inhibición de la actividad de esta enzima inducida por la MDMA, ya que el pre-tratamiento con flunaricina (bloqueante de la entrada de calcio a través de canales de calcio) atenúa significativamente el efecto inhibitorio de la MDMA sobre la TPH (Johnson *y col.*, 1992).

El grado de respuesta hipertérmica que se produce en la rata inmediatamente después de la administración de MDMA influye en el grado de inhibición de la TPH (Che *y col.*, 1995). Así, cuando la MDMA se administra a temperatura ambiente de 25 °C y se produce en la rata una marcada hipertermia, se observa una pronunciada reducción de la actividad de la TPH en el hipocampo, el estriado y la corteza; por el contrario, cuando la MDMA se administra a una temperatura ambiente de 6 °C, se produce una respuesta hipotérmica y se previene o atenúa la inhibición de la TPH (Che *y col.*, 1995; O'Shea *y col.*, 2006).

Estos mecanismos justifican a su vez una disminución irreversible de la actividad de la enzima, que explica la rápida inhibición que se produce tras la administración de la droga, ya que una disminución de su síntesis o de su transporte axonal no produciría una inhibición tan rápida de su actividad (Meek y Neff, 1972; Stone y col., 1987a).

La inhibición de la actividad de la enzima catabólica monoamino oxidasa (MAO) es común a otros análogos anfetamínicos. La MDMA tiene una potencia 10 veces mayor para inhibir la actividad de la MAO-A, responsable del catabolismo de 5-HT, en el cerebro de rata que para inhibir la MAO-B, responsable del catabolismo de DA (Leonardi y Azmitia, 1994).

2.1.A.3. Efecto sobre el sistema dopaminérgico.

La liberación de 5-HT inducida por MDMA va acompañada de una liberación rápida y pronunciada de DA al espacio sináptico, como se ha demostrado en estudios realizados tanto *in vivo* mediante microdiálisis intracerebral (Yamamoto y Spanos, 1988; Gough y col., 1991; Nash y Brodtkin, 1991; Nash y Yamamoto, 1992; Gudelsky y col., 1994; Yamamoto y col., 1995; Koch y Galloway, 1997; Sabol y Seiden, 1998; Colado y col., 1999a; Nixdorf y col., 2001) como *in vitro* utilizando rebanadas estriales (Johnson y col., 1986; Schmidt y col., 1987b; Crespi y col., 1997). Estudios *in vitro* revelan que se requieren concentraciones 10 veces superiores de MDMA para que la liberación de DA en el estriado alcance valores similares a los de 5-HT (Schmidt y col., 1987), si bien estudios *in vivo* no encuentran diferencias en el grado de liberación de DA y 5-HT en el estriado (O'Shea y col., 2005).

La primera evidencia de la liberación *in vivo* de DA tras MDMA se obtuvo mediante estudios de voltametría *in vivo*, demostrándose también que esta liberación es dosis-, tiempo- y región-dependiente (Yamamoto y Spanos, 1988). Así, la administración de MDMA produce una liberación dosis-dependiente de DA en el caudado y, en menor medida, en el núcleo accumbens, siendo la liberación máxima a las 2 h tras la administración de la droga y recuperando valores basales a las 3 h. Dicha liberación de DA en el estriado se ha demostrado también mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* utilizando ratas Dark Agouti, en las que se observa un rápido y significativo incremento en las concentraciones extracelulares de DA en el estriado tras la administración de MDMA (15 mg/kg) y un descenso de los niveles tisulares de sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) (Colado y col., 1999a).

La liberación masiva de DA al espacio extracelular provoca una disminución en el contenido estriatal de DA en el tejido durante las primeras horas tras la administración de la MDMA (Logan y col., 1988; Colado y Green, 1994; O'Shea y col., 2001).

Al igual que ocurre con la liberación de 5-HT, la MDMA estimula la liberación de DA del terminal nervioso mediante dos mecanismos distintos: uno, a través de un proceso de exocitosis

dependiente de calcio (Crespi y col., 1997; Camarero y col., 2002), que puede bloquearse mediante infusión de tetrodotoxina (Yamamoto y col., 1995); y otro, independiente de calcio, a través del sistema de recaptación de DA (Schmidt y col., 1987), que actúa en reverso por la acción de la MDMA (Nash y Brodtkin, 1991).

La implicación de este último proceso en la liberación de DA inducida por MDMA es controvertida. Nash y Brodtkin (1991) observaron que inhibidores de la recaptación de DA (capaces de bloquear la salida del neurotransmisor), como mazindol o el compuesto GBR12,909, antagonizan la liberación de DA inducida por la MDMA perfundida directamente en el cerebro. Koch y Galloway (1997) y Shankaran y col., (1999b) mostraron el mismo efecto, los primeros *in vitro*, utilizando rebanadas de cerebro, y los últimos *in vivo*, co-administrando sistémicamente MDMA y mazindol. Sin embargo, Mehan y col., (2002a) encontraron que GBR12,909 no solamente no previene el incremento en la liberación de DA, sino que produce un aumento en la concentración extracelular de este neurotransmisor. Esto sugiere que la MDMA entra en el terminal dopaminérgico por difusión y no a través del transportador (Zaczek y col., 1990; O'Shea y col., 2001), o bien, es posible que las diferencias observadas entre autores sean debidas a las diferentes vías de administración de la MDMA, tal y como apuntan Mehan y col. (2002), a diferencias en la temperatura ambiental o incluso en la cepa de ratas utilizada (Colado y col., 2004).

No obstante, siguen existiendo evidencias que apoyan la teoría de la liberación de DA a través del transportador de DA. Así, Kanthasamy y col. (2002) observaron que la infusión intraestriatal de un oligonucleótido antisentido complementario al ARNm del transportador de DA, que resulta en una reducción del 70 % en el número de transportadores de DA, disminuye significativamente la liberación de DA en el estriado inducida por MDMA.

En cuanto al mecanismo por el cual la MDMA altera la función del sistema de transporte de DA, se ha descrito la implicación de un mecanismo de fosforilación proteica asociado al transportador, ya que se ha observado, mediante estudios *in vitro* con sinaptosomas estriatales, que la disminución en la recaptación de [³H]-DA tras MDMA se previene mediante el uso de dos inhibidores de la proteína kinasa C (PKC), NPC 15437 y Ro 31-7549 (Hansen y col., 2002). Recientemente, se ha visto, en estudios *in vivo*, que inhibidores de PKC, como bisindolmaleimida (BIM) o clorido-celeritrina, atenúan la liberación de DA inducida por MDMA en el estriado, e, inversamente, activadores de PKC como forbol 12,13-dibutirato (PDBu) incrementan la liberación de DA inducida por la droga (Nair y Gudelsky, 2004).

Parece ser que el aumento del calcio y sodio intracelular también está implicado en la alteración del sistema de transporte de DA; Nixdorf y col., (2001) demostraron que la liberación de DA estriatal mediada por el transportador de DA se potencia al co-administrar malonato, sugiriendo que el aumento en la acumulación de calcio y sodio intracelular que produce el malonato, debido a la

inhibición de la sodio/potasio adenosina trifosfatasa (Na/K ATPasa), es el causante de este proceso, unido a la inhibición de la producción de energía debido a este compuesto, haciendo a los terminales dopaminérgicos vulnerables a MDMA.

Existen abundantes evidencias que señalan la implicación del sistema serotoninérgico en la liberación de DA inducida por MDMA. Así, el pre-tratamiento tanto con 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI), agonista selectivo del receptor 5-HT₂, como con 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeODMT), agonista 5-HT no selectivo, potencia significativamente la liberación de DA estriatal inducida por MDMA (Gudelsky y *col.*, 1994), mientras que la infusión central de ritanserina, antagonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}, bloquea completamente estos receptores y atenúa significativamente la liberación de DA inducida por MDMA en la sustancia nigra y en el estriado (Yamamoto y *col.*, 1995). Por otro lado, la liberación de DA inducida por MDMA en el estriado se atenúa mediante el pre-tratamiento con fluoxetina, inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, sugiriendo la implicación de 5-HT en esta respuesta, al menos en este área cerebral (Koch y Galloway, 1997).

La MDMA es capaz de inhibir la recaptación de DA al interior del terminal al unirse al sistema de transporte de DA (Steele y *col.*, 1987; Johnson y *col.*, 1991; Berger y *col.*, 1992). El transporte vesicular de DA, VMAT-2, también se inhibe tras MDMA (Hansen y *col.*, 2002). Ambos hechos contribuyen también al incremento en la concentración extracelular de DA.

No obstante, el incremento en la concentración extracelular de DA también se relaciona con la capacidad que posee la MDMA de inhibir el metabolismo de la DA, ya que disminuye la actividad de la MAO (Leonardi y Azmitia, 1994). Este efecto explica el descenso observado en la concentración de sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado de ratas inmediatamente después de la administración de una dosis única de MDMA (Colado y *col.*, 1999c). Aunque la reducción en los niveles de DOPAC y HVA podría atribuirse a una inhibición de la síntesis de DA provocada por MDMA, esta hipótesis no parece probable puesto que, al contrario que ocurre con la 5-HT, se ha demostrado que la MDMA no altera la actividad de la enzima responsable de su síntesis, la tirosina hidroxilasa (TH) (Stone y *col.*, 1986).

Con todo esto, la teoría más aceptada que integra los mecanismos de aumento de la concentración de DA extracelular por MDMA propone que la MDMA aumenta la liberación de DA a través de la reversión del transportador dopaminérgico y, a su vez, la 5-HT liberada por MDMA interacciona con sus receptores produciendo la liberación de la DA vesicular mediante un proceso dependiente de calcio (Rudnick y Wall, 1992; Yamamoto y *col.*, 1995; Gudelsky y Nash, 1996; Bankson y Cunningham, 2001).

2.1.A.4. Efecto sobre otros sistemas de neurotransmisión.

Aunque la MDMA ejerce su acción principalmente en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico, también existen estudios sobre otros sistemas de neurotransmisión.

- Sistema noradrenérgico.

La MDMA provoca la liberación de noradrenalina (NA) de manera directa en rebanadas de hipocampo (Fitzgerald y Reid, 1990) y bloquea su recaptación en sinaptosomas hipotalámicos (Steele y col., 1987). Como consecuencia, se observa una disminución en el contenido tisular de NA y, en mayor medida, de su metabolito, el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), en hipocampo, hipotálamo y cerebelo a las 3 h tras la administración de la MDMA, efecto que revierte completamente a las 24 h de la administración (Logan y col., 1988). Sin embargo, la efectividad de la MDMA sobre la liberación de NA *in vivo* no es clara por la ausencia de estudios de microdiálisis.

La liberación de NA inducida por MDMA es debida a la capacidad de la droga para unirse al transportador de NA, ya que la administración de desipramina inhibe dicha liberación en rebanadas cerebrales (Fitzgerald y Reid, 1990).

No obstante, la administración repetida de dosis bajas de MDMA inhibe la descarga de NA en el locus coeruleus (Piercey y col., 1990), aunque no está claro si éste es un efecto directo, por activación de receptores α_2 -adrenérgicos, que se han demostrado desensibilizados de forma transitoria por la administración repetida de MDMA (Arrue y col., 2003), o indirecto, mediante la activación del sistema 5-HT. Además, se ha descrito una interacción entre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico en el locus coeruleus: la inhibición de la síntesis de 5-HT o la inhibición de la recaptación de 5-HT en este área incrementan las concentraciones extracelulares de NA (Mateo y col., 2000). Así, la administración repetida de MDMA provoca una liberación aguda de 5-HT, que facilita la liberación de NA, la cual desensibiliza los receptores α_2 -adrenérgicos en el locus coeruleus originando a su vez una disminución en la descarga noradrenérgica (Arrue y col., 2003).

- Sistema GABAérgico.

Mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* se ha demostrado que la administración de MDMA (20 mg/kg) provoca una disminución gradual en la concentración extracelular del ácido γ -aminobutírico (GABA) en la sustancia nigra (Yamamoto y col., 1995). Sin embargo, en el área tegmental ventral (ATV), la MDMA produce un aumento en la liberación de GABA de manera dosis-dependiente hasta la dosis de MDMA de 5 mg/kg, produciéndose disminución en la liberación a partir de la dosis de 10 mg/kg (Bankson y Yamamoto, 2004). Este hecho parece indicar que la MDMA podría afectar a la concentración extracelular de GABA por distintos mecanismos en la sustancia nigra y en el ATV.

En la sustancia nigra, el descenso en los niveles de GABA tras la administración de MDMA es consecuencia de la activación de los receptores 5-HT_{2A/2C}, por el aumento en la liberación de 5-HT que produce la MDMA (Yamamoto y col., 1995; Sprague y col., 1998; Bankson y Cunningham, 2001). Además, un descenso en la actividad de las interneuronas GABAérgicas resulta en un incremento en la liberación de DA, al reducirse la inhibición que ejerce el GABA sobre los terminales dopaminérgicos (Nash, 1990). Así, la infusión central de ritanserina (antagonista de los receptores 5-HT_{2A/2B}) previene el descenso en la concentración extracelular de GABA y recupera la inhibición que GABA produce sobre los terminales dopaminérgicos, atenuándose la liberación de DA en estriado y sustancia nigra (Yamamoto y col., 1995). Por lo tanto, un descenso en la actividad GABAérgica, consecuencia de la interacción de 5-HT (liberada por MDMA) con sus receptores 5-HT₂, estaría asociado a un incremento en la liberación de DA (Grover y Linder, 1983).

Recientemente, Bankson y Yamamoto (2004) han demostrado mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* que la liberación de GABA al espacio extracelular en el ATV inducida por MDMA está mediada por la activación de los receptores 5-HT_{2A/2C}. Se sabe que el GABA inhibe la liberación de DA en el ATV a través de los receptores 5-HT_{2C}, y, en consecuencia, también en el núcleo accumbens, al disminuir la liberación de DA en las interneuronas mesolímbicas que proyectan en el núcleo accumbens (Stanford y Lacey, 1996); así se justifica que MDMA produzca una menor liberación de DA en el núcleo accumbens que en la sustancia nigra y estriado (Bankson y Yamamoto, 2004).

- Sistema glutamatérgico.

Por un lado, se ha demostrado mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* que dosis repetidas de MDMA i.p. no producen cambios en la concentración extracelular de glutamato en el estriado de rata (Nash y Yamamoto, 1992); sin embargo, la infusión directa de MDMA en el núcleo accumbens, produce una disminución en la liberación de dicho neurotransmisor (White y col., 1994). Este efecto de inhibición de la descarga de glutamato está mediado tanto por la liberación de DA, dado que dicha inhibición se bloquea parcialmente con el antagonista de DA, SCH39166, como por la liberación de 5-HT, ya que se bloquea con los inhibidores de la síntesis de 5-HT y catecolaminas, p-clorofenilalanina y AMPT, o el inhibidor de la recaptación de 5-HT, fluoxetina (Obradovic y col., 1996).

- Sistema colinérgico.

Hay pocos estudios acerca de la acción de la MDMA sobre este sistema. Existen evidencias *in vitro* de que la MDMA produce una liberación dosis-dependiente de acetilcolina (ACh) en rebanadas estriatales que puede ser bloqueada mediante el antagonista del receptor de histamina H₁ y mediante inhibidores de calcio y tetrodotoxina; sin embargo, esta liberación no se ve afectada por

antagonistas de los receptores D₁, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ ni por antagonistas del receptor muscarínico de ACh (Fischer y col., 2000).

No obstante, recientemente, se ha demostrado mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* que la administración sistémica de MDMA produce un aumento en la liberación de ACh en el hipocampo y en la corteza prefrontal y que dicha liberación en la corteza prefrontal, pero no en el hipocampo, depende de mecanismos serotoninérgicos y dopaminérgicos (Nair y Gudelsky, 2005; 2006).

2.1.A.5. Efecto sobre los transportadores y receptores de neurotransmisores.

La MDMA tiene afinidad por los tres transportadores presinápticos de monoaminas, si bien su afinidad es 10 veces mayor para el transportador de 5-HT que para el de DA y NA (Battaglia y col., 1988a).

La afinidad de la droga por los receptores de neurotransmisores clásicos es variable: posee gran afinidad por los receptores 5-HT₂, α_2 -adrenérgicos, M₁ muscarínicos y H₁ histamínicos; afinidad media por los M₂ muscarínicos, α_1 -adrenérgicos, β -adrenérgicos y 5-HT₁; y afinidad baja por los D₁ y D₂, receptores opiodes y para benzodiacepinas (Battaglia y col., 1988a). Dado que la administración aguda de MDMA a las dosis de 10 y 15 mg/kg resulta en concentraciones cerebrales de MDMA del rango de micromolar (Esteban y col., 2001), el grupo de receptores de mayor afinidad parece ser el responsable de los efectos psicotrópicos y neurotóxicos de la droga (Green y col., 2003).

La afinidad de la MDMA por el receptor 5-HT₂ es muy alta, cercana a la de un agonista de dicho receptor (Lyon y col., 1986). El estereoisómero *levo* presenta mayor potencia hacia el receptor 5-HT_{2A} mientras que el *dextro* hacia 5-HT_{2C} (Nash y col., 1994). La activación de los receptores 5-HT_{2A} está asociada con los efectos alucinógenos de la droga (Egan y col., 1998). Sin embargo, la afinidad de la MDMA por el receptor 5-HT_{2A} humano es bastante menor que por el receptor de rata (Sadzot y col., 1989), lo que coincide con la baja incidencia de alucinaciones inducidas por la MDMA en humanos.

Se ha observado también que la MDMA posee alta afinidad y eficacia por un nuevo receptor citoplasmático acoplado posiblemente a la adenil ciclasa (Bunzow y col., 2001). Sin embargo, el nivel de expresión de este receptor en el cerebro de rata es bajo, por lo que su relevancia en los efectos psicotrópicos de la droga no está clara.

2.1.A.6. Efecto sobre la inducción de genes tempranos

La expresión localizada de genes tempranos inducida por MDMA puede ser útil para conocer la localización de las áreas cerebrales asociadas con efectos específicos funcionales o comportamentales.

- c-fos.

La inducción de c-fos, tanto de su ARNm como de la proteína, tras MDMA se localiza principalmente en la corteza cerebral, estriado, septum lateral, núcleo accumbens, amígdala y núcleos paraventriculares del tálamo (Hashimoto y *col.*, 1997; Erdtmann-Vourliois y *col.*, 1999; Stephenson y *col.*, 1999). Esta inducción se observa al menos a las 2 h tras la administración de MDMA y retorna a valores basales a las 24 h (Dragunow y *col.*, 1991). También se ha observado una elevada expresión de c-fos en el área preóptica, área asociada con el control de la temperatura, y en el núcleo oralis pontino reticular, asociado con el control de la masticación, lo que podría relacionarse con la hipertermia y el bruxismo que muestran los consumidores de éxtasis (Stephenson y *col.*, 1999).

Mediante estudios de doble localización, se determinó que en el estriado no existen neuronas marcadas doblemente con c-fos y parvalbúmina o neuropéptido Y (Dragunow y *col.*, 1991) y en los núcleos del rafe son pocas las neuronas que expresan c-fos tras MDMA (Stephenson y *col.*, 1999), lo que implica que estas neuronas no se activan tras MDMA.

La expresión de c-fos en estriado y núcleo accumbens es inhibida por el pretratamiento con MK-801, antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), y metoclopramida, antagonista del receptor de DA D₂, indicando la implicación de dichos receptores en la expresión de c-fos tras MDMA. Sin embargo, ni el antagonista del receptor de DA D₁, SCH23390, ni el inhibidor de la recaptación de 5-HT, fluoxetina, afectan a la expresión de c-fos (Dragunow y *col.*, 1991; Schatz y *col.*, 2000).

Recientemente, se ha visto que variaciones en la temperatura ambiente modifican la expresión de c-fos inducida por MDMA. Así, a una temperatura ambiente elevada (30 °C) se observa un aumento en la expresión de c-fos inducida por MDMA en varias estructuras cerebrales implicadas en la termorregulación, en la osmorregulación, en el comportamiento social y en las vías de refuerzo de la droga (Hargreaves y *col.*, 2007). Esto es importante ya que se ha demostrado que el consumo de MDMA en ambientes calurosos potencia los efectos reforzantes y sociales de la droga (Bedi y Redman, 2006).

- Erg-1.

Al igual que c-fos, erg-1 se considera marcador de la activación neuronal tras un estímulo neuroquímico. A nivel constitutivo, erg-1 se expresa de manera más pronunciada que c-fos. La inducción del ARNm de erg-1 tras MDMA sigue el mismo patrón de expresión que c-fos en la corteza prefrontal y el estriado, pero adicionalmente se expresa en el giro dentado del hipocampo. Su inducción se inhibe mediante el pretratamiento con MK-801 y, al contrario que c-fos, también con SCH23390 y fluoxetina, pero no con SR46349B, antagonista del receptor 5-HT_{2A} (Shirayama y *col.*, 2000).

- Arc.

La inducción de arc, asociado al desarrollo de plasticidad sináptica (Steward y Worley, 2001), sigue el mismo patrón de expresión que c-fos y erg-1, pero incluyendo la región CA1 del hipocampo y excluyendo el giro dentado (Beveridge y col., 2004). El pretratamiento con fluoxetina inhibe la expresión del ARNm de arc en corteza frontal, pero no parietal (Aston y Elliott, 2002), por lo que se ha implicado al transportador de 5-HT en dicha inducción. Esto está de acuerdo con estudios previos que demuestran una regulación al alza de este gen por incrementos en la actividad serotoninérgica cerebral (Pei y col., 2000).

2.1.A.7. Efecto sobre la formación de radicales libres.

Colado y col. (1997a) proporcionaron la primera evidencia directa de la formación de radicales libres tras MDMA utilizando la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo* y el método atrapador del salicilato; perfundieron ácido salicílico a través de una sonda implantada en el hipocampo de la rata, demostrando que la administración periférica de MDMA provoca la conversión del ácido salicílico en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA). Es conocido que esta conversión sólo ocurre en presencia de radicales libres (Halliwell y col., 1991), lo que demuestra la relación directa entre éstos y la administración de MDMA.

La formación de radicales libres tiene lugar en los terminales serotoninérgicos, ya que el pretratamiento con fenfluramina (que lesiona las neuronas serotoninérgicas) previene el incremento en los niveles de 2,3-DHBA inducido por MDMA (Colado y col., 1997a). Esta afirmación fue apoyada por un estudio posterior llevado a cabo por Shankaran y col., (2001), quienes encontraron que el tratamiento con fluoxetina disminuye la formación de radicales libres inducida por MDMA, indicando también que la producción de radicales libres implica la activación del transportador de 5-HT.

Numerosos autores han descrito que la inhibición de la formación de radicales libres protege frente a los efectos neurotóxicos que provoca la droga a largo plazo. Dada su relación con el mecanismo de acción y los efectos a largo plazo que provoca la MDMA, este apartado se discutirá con más detalle más adelante (*apartado 4.2.*).

2.1.A.8. Efecto sobre la temperatura corporal.

Uno de los efectos más característicos a nivel sistémico que produce la MDMA es un aumento en la temperatura corporal de los animales. Se trata de un efecto fisiopatológico serio, que determina la severidad de la neurotoxicidad inducida por la droga (*apartado 4.1.*).

En la rata, la administración de MDMA a temperatura ambiente estándar (20-22 °C), produce una respuesta hipertérmica consistente en la elevación de la temperatura corporal de los animales entre 1-2 °C, alcanzando un pico a los 40-60 minutos tras la inyección de la droga (Nash y col., 1988;

Schmidt y col., 1990a; Colado y col., 1993; Dafters, 1994; Broening y col., 1995; Che y col., 1995; Malberg y col., 1996; O'Shea y col., 1998). Sin embargo, únicamente dos grupos han descrito el caso contrario, que MDMA produce hipotermia en condiciones de temperatura ambiente estándar (Marston y col., 1999; Malberg y Seiden, 1998), siendo necesaria la administración de la droga en condiciones de temperatura ambiente elevada, 30 °C, para observar un efecto hipertérmico (Malberg y Seiden, 1998). Esta última observación indica que la respuesta hipertérmica que produce la MDMA se ve afectada por las condiciones de temperatura ambiente a la que se administra.

En general, la administración de MDMA en condiciones de elevada temperatura ambiente produce un aumento de la temperatura corporal de las ratas (hipertermia), mientras que el mismo tratamiento en condiciones de temperatura ambiente baja provoca una respuesta hipotérmica. Así, Dafters (1994) observó que la administración de MDMA a ratas mantenidas a 11 °C provoca un descenso dosis-dependiente de la temperatura corporal, mientras que en ratas mantenidas a 24 °C, la MDMA produce una respuesta hipertérmica. Así mismo, Broening y col. (1995) observaron que la administración de MDMA en ratas de 40 y 70 días de edad a una temperatura ambiente de 10 °C produce hipotermia, si bien dichas ratas manifestaron hipertermia cuando la droga se administró a una temperatura ambiente de 25 y 33 °C. No obstante, ratas de 10 días de edad no mostraron cambios en su temperatura corporal, lo que indica que el efecto de la MDMA sobre la temperatura corporal de los animales es dependiente de la edad. Posteriormente, Dafters y Lynch (1998) observaron la hipertermia inducida por MDMA a 22 °C y la hipotermia a temperatura ambiente de 17 °C, indicando que la respuesta a MDMA es sensible a pequeños cambios de temperatura ambiente, situándose el punto de inflexión muy cercano a la temperatura ambiente habitual en que se mantienen los animales (20 °C).

La respuesta hipertérmica inducida por MDMA también puede verse intensificada mediante cambios en la temperatura ambiental. Así, la administración repetida de dosis bajas de MDMA en condiciones de temperatura ambiente de 19 °C produce una respuesta hipertérmica, cuyo pico se intensifica al incrementar la temperatura ambiente a 30 °C (Green y col., 2004; Sánchez y col., 2004).

Por otro lado, la administración previa de una o varias dosis neurotóxicas de MDMA altera la capacidad de termorregulación de las ratas, que se manifiesta cuando son expuestas a una temperatura ambiental elevada (Dafters y Lynch, 1998). Así, una única dosis neurotóxica de MDMA administrada 33 días antes de situar a los animales a una temperatura ambiental elevada (30 °C), provoca en ellos una elevación de la temperatura rectal más acusada que en animales no inyectados previamente con la droga, que se mantiene cuando los animales son devueltos a una temperatura ambiente estándar de 20 °C (Mechan y col., 2001).

Se han estudiado los mecanismos de termorregulación tras la administración de MDMA en la rata, monitorizando la tasa metabólica, la pérdida de agua evaporada y la temperatura rectal de ratas

mantenidas a una temperatura ambiente de 10, 20 y 30 °C (Gordon y col., 1991). La tasa metabólica es mayor en animales tratados con MDMA respecto a sus controles a las temperaturas ambientales de 20 y 30 °C, y no varía a 10 °C. La pérdida de agua evaporada incrementa en los animales tratados con MDMA conforme aumenta la temperatura ambiental. De la misma manera, la temperatura rectal es mayor conforme aumenta la temperatura ambiente: a 10 °C se produce hipotermia en los animales tratados con MDMA respecto al grupo control, a 20 °C no se observan diferencias entre ambos grupos y a 30 °C se produce una respuesta hipertérmica (Gordon y col., 1991). Estos resultados demuestran que la MDMA altera los mecanismos de termorregulación de la rata, siendo estos efectos dependientes de la temperatura ambiental.

La MDMA también puede afectar a los mecanismos normales de pérdida de calor del animal. Mehan y col. (2002a) descubrieron que la temperatura de la cola de las ratas permanece inalterada tras una dosis de MDMA que produce hipertermia en el animal. Dado que la dilatación de los vasos de la cola es uno de los principales mecanismos de pérdida de calor corporal en la rata (Grant, 1963), estos datos parecen indicar que la MDMA interfiere con dichos mecanismos de pérdida de calor. Esta idea se sustenta con la observación de que ratas mantenidas en jaulas de suelo acrílico tienen una mayor respuesta hipertérmica que aquellas situadas en jaulas con suelo de rejilla (Gordon y Fogelson, 1994) y que ratas con restricción de agua también presentan mayor hipertermia (Dafters, 1995).

Además, se produce un efecto de sensibilización a la hipertermia inducida por MDMA, ya que la administración de dosis de 7,5 mg/kg de MDMA durante 14 días consecutivos produce un incremento en la hipertermia de los animales a lo largo de los días (Dafters, 1995). Sin embargo, este efecto depende del protocolo de administración y del intervalo entre dosis, puesto que la administración de una o dos dosis de 4 mg/kg diarias durante 4 días sólo produce hipertermia tras la primera inyección (O'Shea y col., 1998).

Farmacología de la hipertermia

El mecanismo implicado en la respuesta hipertérmica tras MDMA es todavía motivo de controversia ya que hay autores que responsabilizan de ella a la 5-HT mientras que otros implican a la DA, existiendo evidencias que respaldan ambas hipótesis. En el primer caso, se ha observado que la administración de triptófano junto con un inhibidor de la MAO (Grahame-Smith, 1971b), o varios agonistas serotoninérgicos, como el 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeODMT) (Grahame-Smith, 1971b) o el MK212 (Yamawaki y col., 1983), o así como una sustancia liberadora de 5-HT, como es la p-cloroanfetamina (PCA), (Colado y col., 1993) provocan una respuesta hipertérmica. Además, también se ha observado que la hipertermia inducida por MDMA está mediada por receptores serotoninérgicos (Shankaran y Gudelsky, 1999). Sin embargo, la administración de fluoxetina, un inhibidor de la recaptación de 5-HT, inhibe completamente la liberación de 5-HT tras MDMA pero no

tiene efecto alguno sobre la respuesta hipertérmica (Mechan y col., 2002a). Estos resultados confirman estudios anteriores que miden estos dos parámetros pero en grupos separados de animales (Schmidt y col., 1990a; Berger y col., 1992; Malberg y col., 1996). La disociación de los efectos que provoca la MDMA sobre la liberación de 5-HT y sobre la temperatura corporal indica que en la respuesta hipertérmica debe estar implicado otro neurotransmisor distinto a 5-HT. Además, ni metisergida ni ritanserina, antagonistas selectivos de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, inhiben la hipertermia producida por la droga (Mechan y col., 2002a). No obstante, los datos existentes en la literatura son contradictorios, ya que recientemente Herin y col. (2005) han demostrado la participación del receptor 5-HT_{2A} en la hipertemia inducida por la droga.

Por otro lado, un déficit en el sistema serotoninérgico, como el que produce la MDMA o fenfluramina a largo plazo en el cerebro de la rata, provoca, tras una nueva administración de MDMA, una menor respuesta hipertérmica en ratas tratadas a temperatura ambiente estándar (Shankaran y Gudelsky, 1999) y una mayor pérdida en la capacidad de termorregulación (Saadat y col., 2005). La disminución de 5-HT inducida por MDMA podría ser la responsable de la pérdida del mecanismo de termorregulación provocada por la droga.

De esta manera, se ha implicado a la liberación de DA en la respuesta hipertérmica inducida por MDMA. Así, la administración de SCH23390, antagonista del receptor D₁, aunque no remoxipride, antagonista del receptor D₂, inhibe dicha respuesta hipertérmica de manera dosis-dependiente. Estos resultados llevan a la conclusión de que la MDMA debe producir hipertermia mediante la liberación de DA, la cual actúa sobre sus receptores D₁ para producir el efecto (Mechan y col., 2002a). Esta teoría también se apoya por el hecho de que el vaciamiento previo de las reservas de DA con reserpina o la inhibición de su síntesis con AMPT inhiben la respuesta hipertérmica (Yuan y col., 2002).

Un estudio de Sprague y col. (2004) señala la implicación de los receptores α 1- y β 3-adrenérgicos en el efecto agudo termogénico que induce la MDMA. Así, la respuesta hipertérmica inducida por MDMA (40 mg/kg, s.c.) se atenúa notablemente tras el pretratamiento con prazosin y SR59230A, antagonistas α 1- y β 3-adrenérgicos, respectivamente. Por lo tanto, la hipertermia inducida por MDMA parece ser el resultado de una activación del sistema nervioso simpático y de los ejes hipotalámico-hipofisario-adrenal e hipotalámico-hipofisario-tiroideo. La liberación de NA inducida por MDMA genera calor mediante la activación de la proteína de desacoplamiento UCP3 a través de los receptores α 1- y β 3-adrenérgicos y, a su vez, produciría la pérdida de la capacidad de disipar calor debido a una vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático (Mills, y col., 2004).

2.1.A.9. Efectos comportamentales.

Tras la administración de MDMA a la rata, se observan de forma inmediata dos efectos característicos: hiperactividad locomotora y el llamado síndrome serotoninérgico (Spanos y

Yamamoto, 1989; Slikker y col., 1989; Colado y col., 1993; Dafters, 1994). Se conoce como síndrome comportamental serotoninérgico a un conjunto de efectos producidos por la masiva liberación de 5-HT, que se manifiesta por un incremento en la hiperactividad, movimiento recíproco de patas, movimiento de cabeza a uno y otro lado, piloerección, abducción de miembros posteriores, ataxia, erección peneana, eyaculación, salivación, defecación y, dependiendo de la dosis, pueden observarse convulsiones y llegar a la muerte del animal (Green y col., 1995).

Junto con estos efectos, la MDMA produce un incremento en la actividad locomotora. Callaway y col. (1990) demostraron que este aumento en la actividad locomotora es dosis-dependiente y se previene mediante el pretratamiento con fluoxetina, lo que se relaciona con la liberación masiva de 5-HT que induce la MDMA, si bien, otros autores la relacionan con la liberación conjunta de DA y 5-HT (Yamamoto y Spanos, 1988; Marston y col., 1999; McCreary y col., 1999). Parece ser que el receptor 5-HT_{2A} está implicado en la respuesta locomotora inducida por MDMA, ya que el pretratamiento con MDL100,907, antagonista de dicho receptor, reduce la hiperactividad tras MDMA (Kehne y col., 1996). También es prevenida por el pretratamiento con GR127935, antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D}, pero no con antagonistas 5-HT_{1A} (Mc Creary y col., 1999). Los receptores 5HT_{2B/2C} parecen ejercer una acción inhibitoria, ya que su bloqueo mediante el antagonista SB206553 potencia la hiperactividad inducida por MDMA (Bankson y Cunningham, 2002). Más recientemente, se ha observado que el tratamiento crónico con DOI, agonista 5-HT_{2A}, produce un aumento en la hiperactividad inducida por MDMA (Ross y col., 2006).

El aumento de la actividad locomotora tras MDMA podría reflejar el incremento en la transmisión dopaminérgica mediada por 5-HT en el núcleo accumbens (McCreary y col., 1999; O'Shea y col., 2005); de hecho, la hiperlocomoción producida por anfetaminas se ha considerado generalmente como el resultado de un incremento en la actividad dopaminérgica en el área mesolímbica (Fibiger y Phillips, 1974; Kelly y col., 1975).

2.1.B. Efectos a largo plazo.

Los efectos a largo plazo son los más preocupantes y los verdaderos responsables de los efectos neurotóxicos que produce la droga (Ricaurte y col., 1992).

2.1.B.1. Efectos sobre el sistema serotoninérgico.

Como se ha mencionado anteriormente, la administración de MDMA provoca una disminución aguda en la concentración de 5-HT y 5-HIAA en diversas estructuras cerebrales, niveles que retornan a valores basales a las 24 h de la administración de la droga. Sin embargo, posteriormente, comienza de nuevo una disminución gradual del contenido indólico, llegando a observarse una reducción del 74 % una semana después de la administración de la droga (Schmidt y col., 1987a). Hoy en día existe una abundante evidencia experimental que indica que la

administración tanto de una dosis única o como de dosis múltiples de MDMA en la rata provoca a largo plazo una disminución en la concentración cerebral de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA (Battaglia y col., 1987; Commins y col., 1987; Schmidt, 1987a; Stone y col., 1987c; Slikker y col., 1988; McKenna y Peroutka, 1990; Nash y Yamamoto, 1992; Colado y col., 1993; Farfel y Seiden, 1995; Malberg y col., 1996; O'Shea y col., 1998; Shankaran y Gudelsky, 1998; Wallace y col., 2001).

O'Shea y col. (1998) observaron una disminución dosis-dependiente en el contenido indólico en el hipocampo, estriado y corteza una semana tras la administración de una dosis única de MDMA (10 ó 15 mg/kg). Por el contrario, la administración de una dosis baja de MDMA (4 mg/kg) no ejerce efecto inhibitorio sobre el contenido indólico una semana después de su administración; tampoco se observa efecto tras la administración diaria de la misma dosis durante 4 días consecutivos. Sin embargo, esta misma dosis administrada dos veces al día durante el mismo periodo sí es capaz de producir efecto neurotóxico en todas las áreas examinadas (O'Shea y col., 1998). En general, se requieren dosis altas o dosis bajas repetidas en intervalos cortos de tiempo para observar efecto sobre el contenido indólico a largo plazo.

La dosis de MDMA necesaria para producir este efecto es dependiente de la cepa de rata utilizada. Una de las más sensibles es la rata Dark Agouti, en la cual una dosis única de MDMA (10-15 mg/kg) es suficiente para producir una pérdida del 30-50 % del contenido de 5-HT cerebral (Colado y col., 1995; O'Shea y col., 1998), mientras que cepas como Sprague-Dawley, Hooded Lister o Wistar requieren dosis de 20 mg/kg o superiores para producir el mismo efecto (Colado y col., 1993; Aguirre y col., 1998a; Shankaran y Gudelsky, 1999). En la rata Dark Agouti se ha demostrado persistencia de los marcadores de daño serotoninérgico hasta 8 meses después de una única dosis neurotóxica de MDMA (O'Shea y col., 2006).

Pero además, los efectos a largo plazo de la MDMA sobre el sistema serotoninérgico también dependen de la vía de administración de la droga. Aunque algunos trabajos muestran que los efectos producidos por la administración de la droga vía oral y subcutánea son muy parecidos (Finnegan y col., 1988), otros han demostrado menor neurotoxicidad con la administración oral de la droga, tal vez debido a que a través de esta vía de administración la MDMA produce menor grado de hipertermia (Slikker y col., 1989; De Souza y col., 1997), la cual se ha implicado en el mecanismo de neurotoxicidad de la MDMA (ver *apartado 4.1*).

Por otro lado, la disminución del contenido indólico cerebral es consecuencia tanto de una pérdida o destrucción de terminales y/o axones serotoninérgicos como de una inhibición persistente de la síntesis indólica por inhibición de la TPH. La MDMA produce una marcada y persistente reducción en la actividad de la TPH en varias áreas cerebrales. En ratas Dark Agouti, se ha demostrado una inhibición de la TPH durante, al menos, 8 semanas en el hipocampo y la corteza, y durante 2 semanas en el estriado (O'Shea y col., 2006).

No obstante, la disminución del contenido indólico tras MDMA es principalmente consecuencia de una pérdida o destrucción de terminales y/o axones serotoninérgicos. Existen numerosos estudios bioquímicos e histológicos que demuestran dicha destrucción. Así, la MDMA provoca una disminución en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT (SERT) marcados con [^3H]-paroxetina (Sharkey y col., 1991; Hewitt y Green, 1994; Colado y col., 1997b). Dado que estos lugares se encuentran en los terminales nerviosos serotoninérgicos, su disminución es una medida indirecta indicativa de pérdida o destrucción del terminal y/o axón, considerándose a este parámetro como un índice de degeneración neuronal (Stone y col., 1986; Commins y col., 1987).

Wang y col. (2004, 2005) observaron, mediante estudios de Western blot, que la administración de una dosis de MDMA que disminuye el contenido indólico cerebral y reduce la densidad de lugares de recaptación de 5-HT (SERT), no altera la expresión de SERT, postulando que los efectos a largo plazo de la MDMA sobre este sistema representan respuestas neuroadaptativas a cambios en la distribución de SERT en endosomas, sin producir evidencias detectables de destrucción de terminales y/o axones serotoninérgicos. Sin embargo, recientemente, Xie y col. (2006) han demostrado que la banda de 70 kDa, que previamente se pensaba que correspondía a SERT, no presenta la distribución cerebral conocida de SERT, es resistente al tratamiento con 5,7-dihidroxitriptamina (una neurotoxina serotoninérgica reconocida) y está presente en animales *knock out* en SERT. En contraste, una banda difusa de 63-68 kDa tiene la distribución cerebral esperada para SERT, está marcadamente reducida después de 5,7-DHT y no se observa en animales *knock out* en SERT. La MDMA disminuye, una semana después de su administración, la densidad de esta banda.

Sin embargo, la evidencia directa de la pérdida de terminales y/o axones serotoninérgicos tras MDMA se ha conseguido mediante técnicas histológicas. Utilizando la tinción de plata, se han observado depósitos de plata en rebanadas estriatales tomadas 13-16 h tras la administración de la MDMA, que no se presentan en animales control (Commins y col., 1987). La tinción de Fink-Heimer permite visualizar dendritas fraccionadas y degeneración de terminales axónicos en estriado y corteza, aunque esta técnica no permite identificar el tipo de neurotransmisor que contienen los terminales nerviosos dañados (Commins y col., 1987; Molliver y col., 1990). Mediante inmunohistoquímica, se ha descrito una disminución de la densidad de axones serotoninérgicos en rebanadas de varias estructuras cerebrales tras MDMA (O'Hearn y col. 1988). De la misma manera, Ricaurte y col. (2000) mostraron evidencia de destrucción de terminales y/o axones serotoninérgicos usando un anticuerpo dirigido contra el transportador de 5-HT, un componente estructural e índice de integridad del terminal axónico serotoninérgico. Mediante estas técnicas varios autores han constatado que la degeneración inducida por MDMA es selectiva de terminales serotoninérgicos finos procedentes del núcleo dorsal del rafe, mientras que no altera los axones gruesos

serotoninérgicos cuyo origen es el núcleo medial del rafe ni los cuerpos celulares (O'Hearn y col., 1988; Molliver y col., 1990).

En relación con esto último, la disminución del contenido indólico se observa en mayor medida en el hipocampo, corteza y estriado, zonas ricas en terminaciones nerviosas serotoninérgicas provenientes de los núcleos dorsales del rafe, mientras que el hipotálamo y el tálamo son las zonas menos dañadas, debido probablemente a que poseen una mayor densidad de fibras de paso y núcleos celulares de neuronas serotoninérgicas (Mokler y col., 1987; Stone y col., 1987c; Scanzello y col., 1993).

Otro método adicional para evaluar la neurotoxicidad serotoninérgica es la medida del transporte anterógrado axonal. Callahan y col. (2001) midieron dicho transporte observando el ascenso a través de las proyecciones serotoninérgicas de una molécula radioactiva y demostraron que la MDMA provoca una disminución significativa del transporte axonal. Este mismo efecto también es producido por la toxina serotoninérgica 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT).

Se ha estudiado también si esta pérdida o destrucción de terminales y/o axones serotoninérgicos se acompaña de hipertrofia de astrocitos o astrogliosis, como ocurre con otros compuestos que inducen neurotoxicidad serotoninérgica, como el 5,7-DHT (Bendotti y col., 1994). El daño neuronal producido por MDMA parece que no se acompaña de astrogliosis, medido como un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Pubill y col., 2003; Orio y col., 2004; Wang y col., 2004); sólo un estudio ha demostrado un incremento en los niveles de GFAP en el hipocampo de la rata 1 semana después de la administración de la MDMA (Aguirre y col., 1999).

Regeneración de los terminales serotoninérgicos.

La existencia de regeneración neuronal tras la administración de MDMA en la rata se ha estudiado mediante la cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT marcados con [³H]-paroxetina a distintos tiempos tras la administración de la droga. Battaglia y col. (1988b) observaron que 8 semanas después de la administración de la droga, la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT es de un 40 % con respecto a los controles, a las 26 semanas esta densidad incrementa hasta un 75 %, mientras que a las 52 semanas no existen diferencias entre los animales tratados con MDMA y los controles.

Posteriormente, Scanzello y col. (1993) evaluaron tanto el contenido indólico como la densidad de lugares de recaptación de 5-HT, y realizaron estudios inmunohistoquímicos de fibras nerviosas de 5-HT, hasta un año después de la administración de la droga. La recuperación más temprana del contenido indólico se observa en el hipotálamo a las 8 semanas, mientras que en el hipocampo y estriado se produce a las 16 semanas. La densidad de los lugares de recaptación de

5-HT se recupera a las 32 semanas en la corteza y estriado, mientras que en el hipocampo permanece disminuida 52 semanas después. Todas las regiones cerebrales examinadas recuperaron el contenido indólico 1 año después de la administración de la MDMA. En relación a los cambios morfológicos, existe una reducción en la densidad de axones serotoninérgicos en la corteza parietal 2 semanas después, y sólo 1 de cada 3 animales recuperaron su morfología 52 semanas después (Scanzello y col., 1993).

La reinervación neuronal tras MDMA es región-dependiente, existiendo tasas de recuperación muy distintas para las diferentes áreas cerebrales. Así, Sabol y col. (1996) y, recientemente, O'Shea y col. (2006), observaron que la recuperación del daño serotoninérgico en el estriado es más rápida que en la corteza e hipocampo. Pero además, se ha observado que el patrón de regeneración neuronal es anormal, existiendo hiperinervación en zonas próximas a los cuerpos celulares serotoninérgicos, como amígdala e hipotálamo, y denervación en zonas más distales, como la corteza dorsal (Fischer y col., 1995).

También se han utilizado estudios de autorradiografía del transportador de 5-HT para demostrar la recuperación serotoninérgica. Así, Lew y col. (1996) observaron una reducción máxima de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en hipocampo y corteza a las 2 semanas tras la administración de la MDMA, y una recuperación parcial a las 16 semanas, que en el caso del hipocampo es total a las 52 semanas, pero no es así en la corteza. Esto contrasta con los resultados de Scanzello y col. (1993), quienes encontraron una recuperación total de la disminución indólica en corteza 52 semanas tras la inyección de la MDMA, si bien es de destacar que éstos últimos utilizaron dosis menores de MDMA para sus estudios, lo que puede explicar la diferencia de resultados.

2.1.B.2 Efectos sobre los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico.

Los efectos a largo plazo inducidos por MDMA en el cerebro de la rata afectan principalmente al sistema serotoninérgico, encontrándose muy pocas evidencias de que otros sistemas, como el dopaminérgico y noradrenérgico, se encuentren afectados.

Existen varios autores que no han observado alteraciones en los sistemas dopaminérgico y/o noradrenérgico tras MDMA (Stone y col., 1986; Schmidt y col., 1987b; Sabol y col., 1996; Colado y col., 1997a,b, 1999c), mientras que otros apuntan alteraciones en el sistema dopaminérgico únicamente tras la administración de dosis altas de MDMA. Sabol y col. (1996) y Colado y col. (1999c) describieron que una única dosis de MDMA de 15 mg/kg o, incluso, dosis múltiples de 20 mg/kg (cada 12 h durante 4 días) no inducen cambios en las concentraciones de DA ni NA en estriado, corteza, hipocampo, núcleo olfatorio, amígdala, hipotálamo y ATV. Sin embargo, Mayerhofer y col. (2001) observaron que la administración repetida de MDMA durante 10 días consecutivos (20 mg/kg/día) origina un aumento en la concentración de DA en el núcleo accumbens 4 semanas después del cese del tratamiento, mientras que los niveles de NA se encuentran

disminuidos en este mismo área. La causa del incremento en los niveles de DA puede ser debida precisamente a la disminución de NA en el núcleo accumbens y a la pérdida de terminales serotoninérgicos. No obstante, la MDMA no produce un efecto neurodegenerativo sobre los terminales nerviosos dopaminérgicos y noradrenérgicos, ya que la droga no afecta a la densidad de los lugares de recaptación de DA y NA (Lew y *col.*, 1996; Mayerhofer y *col.*, 2001). Tampoco se han observado cambios sobre la TH (Stone y *col.*, 1986, 1987b).

Parece ser que los efectos a largo plazo de la MDMA sobre estos sistemas están influenciados por el protocolo de administración de la droga y la dosis administrada, así como por la temperatura ambiental. Yuan y *col.* (2002) comprobaron que la inyección de MDMA i.p. (20 mg/kg, 4 veces en un intervalo de 2 h) a una temperatura ambiente de 22 °C no produce efecto sobre la concentración de DA en estriado 4 semanas más tarde, pero el mismo protocolo administrado una temperatura ambiente de 27 °C provoca una reducción en las concentraciones de DA y DOPAC en estriado. Son necesarias dosis altas de MDMA y temperatura elevada para producir efecto tóxico de carácter dopaminérgico en la rata.

2.2. RATÓN

2.2.A. Efectos agudos

Al contrario de lo que ocurre con la rata, existen relativamente pocos estudios referentes a los efectos agudos que produce la MDMA en el cerebro de ratón. Es de destacar la gran diversidad de cepas de ratón empleadas y la utilización de diferentes dosis y protocolos de administración.

2.2.A.1. Efectos sobre el sistema serotoninérgico.

El efecto agudo que produce la MDMA sobre el sistema serotoninérgico en el cerebro de ratón es menos pronunciado que el observado en la rata. Son necesarios protocolos de administración de dosis altas y repetidas para observar una reducción de los parámetros serotoninérgicos. Así, dosis únicas de MDMA (25 y 50 mg/kg, i.p.) apenas alteran el contenido de 5-HT en hipocampo y corteza. Sólo se observa una reducción en los niveles de 5-HIAA a las 3 h, que retorna a valores basales 24 h tras la administración de la droga (Logan y *col.*, 1988; Cadet y *col.*, 1995).

Dosis múltiples de MDMA (20 mg/kg cada 2 h, x 4, i.p.) originan una disminución transitoria y reversible en el contenido de 5-HT estriatal y cortical 12 y 16 h después de su administración (O'Callaghan y Miller, 1994; Jayanthi y *col.*, 1999). Stone y *col.*, (1987b) inyectaron una dosis menor, 15 mg/kg, pero 6 veces, separadas 4 h, y observaron a las 3 h una disminución de 5-HT y 5-HIAA en hipocampo y estriado. Más recientemente, O'Shea y *col.* (2001) observaron que dosis múltiples de MDMA (separadas 3 h) producen, 3 h después de la última inyección, una pequeña disminución en la

concentración de 5-HT y 5-HIAA en corteza e hipocampo, pero apenas observaron efecto en el estriado.

Contrariamente a lo que ocurre en la rata, la disminución en el contenido indólico tras la administración de MDMA no es dosis-dependiente, ya que dosis repetidas de 10, 20 y 30 mg/kg (3 veces cada 3 h) producen una reducción similar en el contenido de 5-HT en corteza e hipocampo (O'Shea y col., 2001); datos similares se obtienen con el 5-HIAA (Colado y col., 2001a).

2.2.A.2. Efecto sobre la Triptófano Hidroxilasa (TPH).

El efecto de la MDMA sobre la TPH en el cerebro de ratón es muy débil, apareciendo inhibida levemente al administrar dosis múltiples de MDMA (Stone y col., 1987).

2.2.A.3. Efecto sobre el sistema dopaminérgico.

La MDMA produce una liberación inmediata de DA en el estriado de ratón. Usando la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo* se ha demostrado que la administración repetida de MDMA (30 mg/kg, 3 veces cada 3 h) produce un aumento en la concentración extracelular de DA en el dializado estriatal, que alcanza su valor máximo 1 h después de cada inyección (Camarero y col., 2002). La primera administración de MDMA sólo produce un incremento moderado en la concentración extracelular de DA, que aumenta progresivamente con las dos dosis siguientes (Colado y col., 2001a). De forma inversa, la concentración de sus metabolitos, DOPAC y HVA, desciende en el dializado estriatal de forma progresiva, comenzando 1 h después de la administración de MDMA (Camarero y col., 2002). Esta disminución en la concentración de DOPAC podría deberse a la capacidad de la MDMA de inhibir la MAO (Yamamoto y Spanos, 1988; Leonardi y Azmitia, 1994). Además, 3 h tras la última administración de MDMA se observa una reducción en la concentración de DA, DOPAC y HVA en el tejido estriatal, siendo esta disminución un proceso dosis-dependiente, a diferencia del efecto sobre la concentración de 5-HT (O'Shea y col., 2001).

En cuanto al mecanismo de liberación de DA, se ha demostrado que la administración de GBR12,909, inhibidor selectivo de la recaptación de DA, no reduce el incremento en la concentración extracelular de DA inducido por MDMA, sino que por el contrario, es capaz de incrementar este efecto (Camarero y col., 2002). Estas observaciones son idénticas a las publicadas por Mechan y col. (2002) en rata e indican que la MDMA penetra en el terminal nervioso dopaminérgico por difusión y no a través del transportador de DA. Además, la perfusión en cerebro de un medio bajo en calcio, a través de una sonda de microdiálisis, reduce significativamente el incremento en la liberación de DA que induce la MDMA (Camarero y col., 2002). Por lo tanto, la liberación de DA que induce la MDMA parece realizarse por un proceso exocitótico calcio-dependiente.

Es conocido que la MDMA tiene baja afinidad por los receptores dopaminérgicos (Battaglia y col., 1988), de manera que los efectos de la MDMA que están mediados por DA son una

consecuencia de la liberación de ésta y no de su interacción directa con los receptores dopaminérgicos (Colado y col., 2004).

2.2.A.4. Efecto sobre otros sistemas de neurotransmisión.

- Sistema noradrenérgico.

La administración de una dosis única de MDMA de 25 mg/kg i.p. produce un descenso en los niveles de NA y de su metabolito, DHPG, en hipocampo, hipotálamo y cerebelo, que se recupera completamente a las 24 h de la inyección (Logan y col., 1988). También se ha descrito que una dosis de 40 mg/kg i.p. es capaz de producir una liberación transitoria de NA en el cerebro de ratones macho CF-1 (Steele y col., 1989).

- Sistema GABAérgico.

La MDMA altera la neurotransmisión GABAérgica ya que la administración de tiagabina y NO-711, inhibidores de los transportadores de GABA, reduce los efectos tóxicos agudos que induce la droga (Peng y Simantov, 2003). Además, tras la administración de la MDMA, se observa un incremento en la expresión del ARNm de los transportadores de GABA tipo 1 (GAT1) y tipo 4 (GAT4) en corteza y cerebro medio (Peng y Simantov, 2003).

La MDMA también altera la expresión de otras proteínas implicadas en la transmisión GABAérgica (Simantov y Peng, 2004). Así, la MDMA disminuye la expresión del ARNm de la septina, asociada a vesículas GABAérgicas (Kinoshita y col., 2000) e involucrada en la liberación de neurotransmisores (Peng y col., 2002), y de la distrofina, asociada con el correcto funcionamiento de los receptores GABAérgicos (Vaillend y Billard, 2002).

2.2.A.5. Efecto sobre la inducción de genes tempranos

- Rnd.

Recientemente, se ha descrito que la MDMA aumenta la expresión del ARNm del gen rnd3 en hipocampo, estriado y corteza prefrontal de ratón hasta 6 h después de su administración (Marie-Claire y col., 2007). Rnd3 pertenece a la subfamilia de genes rnd y codifica una GTPasa Rho implicada en la regulación del citoesqueleto y en la adhesión celular.

2.2.A.6. Efecto sobre la formación de radicales libres.

Los primeros datos indicativos de que la administración de MDMA en el ratón incrementa la formación de radicales libres proceden de un estudio en el que ratones transgénicos con una elevada actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) son resistentes a los efectos neurotóxicos de la MDMA (Cadet y col., 1995). Además, la administración de MDMA disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa y de la catalasa y aumenta el grado de peroxidación lipídica en varias regiones

del cerebro de ratón (Jayanthi y *col.*, 1999). Sin embargo, la evidencia directa de que la administración de MDMA incrementa de forma marcada y mantenida la formación de radicales libres en el estriado de ratón, procede de estudios en los que se utilizó la técnica de microdialisis intracerebral *in vivo* y el método atrapador del salicilato. Esta técnica revela que MDMA incrementa la conversión de salicilato a ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) en el estriado de ratón, una clara indicación de la formación de radicales hidroxilo (Colado y *col.*, 2001a; Camarero y *col.*, 2002).

El incremento en la formación de radicales libres tras MDMA se atenúa mediante el tratamiento con AR-R17477AR, inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), indicando que estos radicales pueden combinarse con el óxido nítrico para formar el ión tóxico peroxinitrito, el cual podría participar en los efectos neurotóxicos producidos por la droga a largo plazo (Colado y *col.*, 2001a; Camarero y *col.*, 2002). El tratamiento con GBR12,909, inhibidor selectivo del transportador de DA, disminuye la formación de radicales libres inducida por MDMA, lo que demuestra que dicho transportador está implicado en la formación de radicales libres (Colado y *col.*, 2001a; Camarero y *col.*, 2002).

Además, la MDMA también reduce la eficacia de los principales sistemas antioxidantes endógenos, como la vitamina E y las proteínas tiólicas (Johnson y *col.*, 2002a). Así, ratones deficientes en vitamina E muestran una mayor susceptibilidad a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MDMA (Johnson y *col.*, 2002a).

2.2.A.7. Efecto sobre la temperatura corporal.

En el ratón, la MDMA produce una respuesta hipertérmica como la observada en otras especies; sin embargo, esto no siempre ocurre y la respuesta varía dependiendo tanto de la cepa de ratones como de la dosis de MDMA usada. Varios grupos han examinado la respuesta hipertérmica en ratones C57BL/6J tras la administración de dosis repetidas de MDMA (20 mg/kg), encontrando que la droga produce una hipertermia de aproximadamente 2 °C (Miller y O'Callaghan, 1994; Johnson y *col.*, 2000, 2002a). Por el contrario, en ratones BALB/c, la administración de MDMA produce una hipotermia dosis-dependiente (Johnson y *col.*, 2002a) y en ratones de la cepa Swiss-Webster, tras dosis repetidas de 10 mg/kg, se produce hipotermia, pero con dosis más altas, de 30mg/kg, se observa una respuesta bifásica: primero hipertermia seguida de hipotermia (O'Shea y *col.*, 2001).

La MDMA también produce un incremento dosis-dependiente en la temperatura corporal de ratones Charles River tras la administración de dosis únicas de 5, 10 y 20 mg/kg (Carvalho y *col.*, 2002), mientras que en ratones NIH/Swiss sólo se observa hipertermia con dosis repetidas de MDMA (20-25 mg/kg, i.p., 3 veces en un intervalo de 3 h). En estos últimos se observa un pico hipertérmico inmediatamente después de cada inyección, siendo la magnitud de la hipertermia mayor tras la primera y segunda inyección de la MDMA (Colado y *col.*, 2001a).

El aumento en la temperatura corporal no se modifica por el pretratamiento con GBR12,909, inhibidor selectivo de la recaptación de DA, por lo que la liberación de DA no parece participar en el mecanismo de hipertermia (O'Shea y col., 2003). Tampoco parece probable que participe la liberación de 5-HT, ya que los niveles de 5-HT a todas las dosis ensayadas fueron muy similares. Por otro lado, en ratones C57BL/6J se ha demostrado que es necesario la metabolización de la MDMA para producir hipertermia, ya que la administración intracerebral de MDMA no produce dicho aumento en la temperatura corporal (Escobedo y col., 2005).

2.2.A.8. Efectos comportamentales.

Al igual que ocurre en la rata, la administración de MDMA en el ratón provoca un aumento en la actividad locomotora y una disminución en la actividad exploratoria.

La respuesta locomotora está mediada en parte por el receptor 5-HT_{1B} (Scearce-Levie y col., 1999; Compan y col., 2003). También se describen efectos ansiogénicos, a dosis bajas, y ansiolíticos, a dosis altas (Lin y col., 1999; Maldonado y Navarro, 2000), así como efectos reforzantes de la droga en esta especie animal (Salzmann y col., 2003; Robledo y col., 2004).

2.2.B. Efectos a largo plazo.

La MDMA en el ratón se comporta de forma más selectiva como una toxina dopaminérgica, si bien, se han observado ciertos efectos sobre otros sistemas. Los ratones son más resistentes que las ratas a la neurotoxicidad inducida por MDMA, debido probablemente a diferencias en la farmacocinética de la MDMA (Stone y col., 1987), por lo que se requieren dosis más altas y repetidas que las usadas en la rata para producir toxicidad.

2.2.B.1. Efectos sobre el sistema serotoninérgico.

Varios autores han descrito que la administración de MDMA en el ratón no altera a largo plazo el sistema serotoninérgico, ya que todos los efectos que produce sobre este sistema son inmediatos y revierten a las 24 h (Logan y col., 1988; O'Callaghan y Miller, 1994; O'Shea y col., 2001). Sin embargo, ciertos protocolos de administración repetida de MDMA pueden provocar cambios mantenidos en ciertos parámetros serotoninérgicos. Así, la administración de 6 dosis de MDMA de 15 mg/kg, por vía s.c., cada 4 h, produce una disminución del contenido indólico cerebral, que se mantiene 2 semanas después, y una inhibición de la actividad de la TPH en estriado e hipocampo, que se mantiene 1 semana después (Stone y col., 1987a). De la misma manera, la administración de MDMA i.p., a una dosis de 50 mg/kg, 2 veces cada 2 h, provoca una reducción de la concentración indólica en hipocampo, estriado y corteza 7 días después (Fornai y col., 2001).

Más recientemente, se ha descrito una disminución en la concentración de 5-HT en el estriado de ratones 4 días después de la administración de MDMA a las dosis de 40 mg/kg y

30 mg/kg 2 veces al día, o 15 mg/kg 2 veces al día durante 2 días. A la dosis mayor, este efecto también se produce en hipocampo y corteza. Además, se observa una disminución en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en hipocampo y corteza, que persiste incluso 82 días después (Itzhak y col., 2003).

2.2.B.2. Efectos sobre el sistema dopaminérgico.

Está ampliamente descrito que la MDMA en el ratón actúa de manera selectiva como una neurotoxina dopaminérgica (Stone y col., 1987a; Logan y col., 1988; Johnson y col., 2002a). Sin embargo, el ratón es más resistente que la rata a los efectos neurotóxicos de la MDMA, requiriéndose dosis repetidas o dosis únicas más elevadas, de 50 mg/kg (Cadet y col., 1995).

Este efecto tóxico de la MDMA en el ratón se manifiesta como una disminución en el contenido de DA y sus metabolitos, DOPAC y HVA, en el estriado (Logan y col., 1988; O'Callaghan y Miller, 1994; O'Shea y col., 2001; Escobedo y col., 2005). Fornai y col. (2001) estudiaron dicho efecto en diversas estructuras cerebrales, observando una reducción en los niveles de DA en el estriado, sustancia nigra y corteza frontal, mientras que la concentración de DA permanece inalterada en hipocampo, hipotálamo y cerebelo.

Por otro lado, la MDMA (20 mg/kg, 4 veces cada 2 h) también inhibe la actividad de la TH 7 días después de su administración, permaneciendo inhibida incluso 3 semanas después (O'Callaghan y Miller, 1994).

Sin embargo, la pérdida del contenido de DA se relaciona principalmente con una destrucción de terminales y/o axones dopaminérgicos. Tal destrucción se demuestra mediante estudios de autorradiografía del transportador de DA (DAT). Así, Mann y col. (1997) demostraron que, una semana después de la administración de MDMA (20 mg/kg, 4 veces cada 2 h), existe una disminución dosis-dependiente en la fijación del ligando específico de dicho transportador, el compuesto [125 I]-RTI-121, en membranas de estriado y núcleo accumbens, lo que podría ser indicativo de una destrucción del terminal dopaminérgico. Dos estudios más recientes también han demostrado una disminución del DAT, el primero mediante marcaje con [3 H]-mazindol (Itzhak y col., 2003) y el segundo mediante la cuantificación de los niveles de proteína de dicho transportador (Reveron y col., 2005).

Existe otro parámetro que también demuestra la toxicidad de la MDMA sobre el sistema dopaminérgico, como es el incremento en los niveles de GFAP en el estriado (O'Callaghan y Miller, 1994; Miller y O'Callaghan, 1995; Johnson y col., 2002), proteína marcadora de astrogliosis, y por tanto, marcadora de daño neuronal (O'Callaghan, 1988).

2.2.B.9. Efectos sobre el sistema noradrenérgico y GABAérgico.

La administración de MDMA en el ratón no afecta a largo plazo al sistema noradrenérgico, de manera que distintos protocolos y dosis de MDMA no alteran las concentraciones de NA y DHPG en cerebelo, corteza frontal, hipocampo, hipotálamo y sustancia nigra, 3 y 7 días después del tratamiento (Logan y col., 1988; Fornai y col., 2001; Johnson y col., 2002b).

En cuanto a la afectación del sistema GABAérgico, existen evidencias de que la MDMA en el ratón produce cambios morfológicos en dichas neuronas. Concretamente, se observa la formación de inclusiones neuronales en neuronas GABAérgicas post-sinápticas en la sustancia nigra, al parecer relacionadas con la liberación masiva de DA que produce la droga inmediatamente después de su administración (Fornai y col., 2003).

2.3. NEONATOS.

Está ampliamente descrito que la MDMA provoca neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo en la rata adulta, que se refleja por una disminución del contenido indólico cerebral así como una reducción de los lugares de recaptación de 5-HT (ver apartado 2.1.B.1.). Sin embargo, los primeros estudios sobre la exposición prenatal a MDMA en ratas no muestran evidencias de toxicidad serotoninérgica en neonatos. Así, la administración de MDMA a ratas gestantes no produce en los neonatos disminución del contenido indólico cerebral ni de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT, en regímenes de administración que sí producen daño serotoninérgico en los animales adultos (St Omer y col., 1991; Colado y col., 1997a; Aguirre y col., 1998b; Kelly y col., 2002). Se ha sugerido que la falta de daño serotoninérgico podría deberse a la ausencia de formación del o de los metabolitos tóxicos de la droga o a una mayor capacidad antioxidante del cerebro inmaduro de estos animales (Colado y col., 1997a).

No obstante, recientemente Galineau y col., (2005) han observado que la exposición prenatal a MDMA (10 mg/kg, s.c.) provoca una reducción en la concentración indólica cerebral del neonato al nacer, sin producir cambios en los transportadores de 5-HT y DA, y reduce fuertemente la liberación de 5-HT y DA inducida farmacológicamente (con fenfluramina y tiramina) en adultos de 70 días que recibieron la droga de forma prenatal. Así mismo, se ha descrito una disminución en el contenido estriatal de 5-HIAA y un aumento de la inmunoreactividad para la TH (Koprich y col., 2003).

Por otro lado, se han estudiado los efectos neurotóxicos de la administración de MDMA a neonatos, desde ratas recién nacidas, que reflejan el efecto en humanos durante la última fase del desarrollo intrauterino, hasta ratas de 30-60 días, que reflejan el efecto en adolescentes, si se quisiera extrapolar el experimento a humanos. La mayoría de los estudios sugieren que la MDMA produce daño serotoninérgico, así como alteraciones en el aprendizaje y en el comportamiento, en el neonato (Meyer y Ali, 2002; Williams y col., 2003; Piper y col., 2005; Piper y Meyer, 2006), si bien la

sensibilidad frente al daño serotoninérgico de la MDMA parece no empezar a desarrollarse en la rata hasta el día 35-40 de vida fuera del útero (Broening y col., 1995; Aguirre y col., 1998b; Piper y Meyer, 2006). Crawford y col. (2006), quienes observaron además una disminución en el contenido de DA en corteza y estriado de neonatos tras la administración de dosis repetidas de MDMA (20 mg/kg, 2 veces al día) durante los días 11-20 postnacimiento, proponen que estos efectos podrían estar mediados por un cambio en la afinidad de los receptores 5-HT_{1A}.

Meyer y col. (2002; 2004) estudiaron el papel de la hipertermia en el mecanismo de neurotoxicidad inducida por MDMA en el neonato y parece ser un factor modulador, ya que los efectos observados sobre el sistema serotoninérgico son independientes de la temperatura corporal de los animales tras la administración de la droga.

También se ha descrito que la administración de MDMA a neonatos, entre los días 1-4 postnacimiento, aunque no produce neurotoxicidad serotoninérgica, sí provoca el síndrome serotoninérgico más pronunciado y una mayor alteración en la capacidad de termorregulación cuando las ratas adultas son expuestas de nuevo a la droga (Piper y Meyer, 2006).

2.4. PRIMATES NO HUMANOS.

Al igual que ocurre en otras especies animales, la MDMA produce toxicidad serotoninérgica y daño neuronal en el primate no humano (Ricaurte y col., 1988a; Slikker y col., 1988; Insel y col., 1989; Wilson y col., 1989; Ricaurte y McCann, 1992; Fischer y col., 1995; Scheffel y col., 1998; Hatzidimitriou y col., 1999). Sin embargo, el mono es una especie más sensible que la rata a los efectos neurotóxicos de la droga, requiriendo dosis menores de MDMA para que se manifieste dicho efecto (Ricaurte y col., 1988a; Ricaurte y McCann, 1992). Así, una única dosis de MDMA de 5 mg/kg en el mono ardilla ocasiona pérdidas en el contenido indólico en el tálamo e hipotálamo, mientras que la administración múltiple origina este efecto en todas las estructuras cerebrales estudiadas (Ricaurte y col., 1988a).

La disminución del contenido indólico inducida por MDMA en el mono depende de la dosis y de la vía de administración de la droga, si bien existen datos contradictorios con respecto a este último factor. Por un lado, Ricaurte y col. (1988a) observaron que la administración oral de la droga es menos efectiva que la s.c., mientras que Kleven y col. (1989) encontraron efectos mayores mediante la administración de MDMA por vía intragástrica.

Además, esta pérdida del contenido indólico se asocia con una disminución en la concentración de 5-HIAA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de monos Rhesus (Insel y col., 1989), que persiste durante aproximadamente 3 meses tras la administración de la droga (Taffe y col., 2001).

La neurotoxicidad serotoninérgica se observa también como una pérdida de lugares de recaptación de 5-HT, marcados con [3 H]-paroxetina, en el cerebro del primate a partir de las 2 semanas de la administración de la MDMA (Ricaurte y col., 1992). Sin embargo, no se observa una regeneración de los terminales axónicos serotoninérgicos, a excepción del hipotálamo, en el que se observa una hiperinervación, con valores de 5-HT y 5-HIAA incrementados en un 140 % y 187 % respectivamente (Ricaurte y col., 1992). Esta ausencia de recuperación serotoninérgica en primates, con relación a la rata, es debida a varios factores: 1) al grado inicial de daño inducido por la droga, que es mayor en el primate; 2) a que los primates tienen un potencial regenerador de sus neuronas serotoninérgicas menor y, 3) al hecho de que la recuperación axonal es inversamente proporcional a la distancia que el axón dañado necesita recorrer para restablecer la conexión sináptica (Ricaurte y col., 1992).

También se ha estudiado el daño serotoninérgico del primate no humano mediante técnicas inmunohistoquímicas, observándose una marcada reducción en la inmunoreactividad de axones finos serotoninérgicos y una apariencia de los axones deforme y engrosada (Ricaurte y col., 1988c; Wilson y col., 1989), que permanece hasta 7 años después de la administración de la droga en regiones neocorticales (Hatzidimitriou y col., 1999). Mediante tomografía de emisión de positrones (PET), utilizando un ligando selectivo del transportador de 5-HT ([11 C] (+)McN-5652), se ha observado una disminución significativa en la fijación del radioligando en hipotálamo y corteza frontal (Scheffel y col., 1998).

En el mono, no existen evidencias de que la MDMA afecte a otros sistemas de neurotransmisión, ni siquiera con protocolos de administración que disminuyen en un 90 % el contenido indólico en el núcleo caudado (Ricaurte y col., 1988a).

Aunque Bowyer y col. (2003) describieron que la MDMA no produce hipertermia en monos inmovilizados, recientemente varios autores han observado una marcada hipertermia tras la administración de MDMA en el primate no humano, al igual que en otras especies animales (Taffe y col., 2006; Crean y col., 2006; Von Huben y col. 2007). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en la rata, la temperatura ambiente no afecta a dicha hipertermia ni, por tanto, a la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

3. Efectos de la MDMA en humanos.

Los estudios sobre los efectos de la MDMA realizados en animales de experimentación deben evaluarse con cautela a la hora de extrapolar sus resultados al ser humano, ya que no es posible hacer comparaciones directas entre unos y otros. En primer lugar, hay que considerar que, en la mayoría de los estudios, la dosis utilizada es bastante superior a la utilizada por los

consumidores, ya que animales más pequeños requieren dosis más altas para obtener los mismos efectos. El cálculo de las dosis se estima mediante la siguiente fórmula:

$$D_{humano}=D_{animal}(P_{humano}/P_{animal})^{0,7}$$

siendo D la dosis de la droga en mg y P el peso corporal en kg.

Así, una dosis de MDMA de 10-15 mg/kg, que provoca daño en ratas Dark Agouti, es equivalente a una dosis de 450-550 mg para un humano de 70 kg de peso. De la misma manera, dosis más bajas pero repetidas (patrón habitual de consumo en el humano), como la dosis de 4 mg/kg, equivalente a 240 mg, también producen neurotoxicidad (O'Shea y col., 1998).

En cuanto a los estudios clínicos realizados en humanos, los de carácter prospectivo están sujetos a estrictas consideraciones éticas; incluso la administración de dosis bajas de MDMA (1,7 mg/kg) ha sido públicamente cuestionada (Vollenweider y col., 2001; McCann y Ricaurte, 2001). Los de tipo retrospectivo están afectados de alta variabilidad por las dosis consumidas, la adulteración de las pastillas y el habitual policonsumo de diversas drogas.

3.1. Efectos agudos.

3.1.A. Efectos psicológicos.

El consumo de éxtasis origina una serie de sensaciones subjetivas buscadas por el consumidor, la más importante y frecuente de las cuales es la capacidad de esta droga para inducir un determinado estado emocional caracterizado por la *empatía*. Así, la MDMA disuelve las barreras psicológicas que nos aíslan de los demás, facilitando la comunicación y la exploración de las relaciones interpersonales. Además, la MDMA facilita el acceso al interior del individuo, abriendo la puerta a la introspección y a la aceptación de uno mismo con sus virtudes y sus defectos. También incrementa la actividad psicomotora y el estado de alerta, disminuye la percepción de fatiga y de sueño (Prada y Álvarez, 1996) y tras su consumo, los sonidos y los colores se perciben más intensos.

Pero estos efectos positivos van acompañados de otros efectos no tan favorables como depresión, irritabilidad, crisis de angustia, alucinaciones visuales y paranoias (Brown y Osterloh, 1987; Creighton y col., 1991, McCann y col., 1996). En un primer momento, tras la ingesta de la droga, la sensación del consumidor es de felicidad, amigabilidad y energía, pero cuando estos efectos pasan, el consumidor siente letargo, decaimiento, irritabilidad, insomnio y depresión. Esta situación de bajo estado de ánimo se podría atribuir al momento en que los depósitos de neurotransmisores están siendo llenados de nuevo, tras la liberación aguda de 5-HT (McKenna y Peroutka, 1990).

Según algunos autores el tratamiento con citalopram o paroxetina previene la aparición de estos efectos (Stein y Rink, 1999), si bien estos resultados no concuerdan con un estudio del grupo de Ricaurte y col. (1993), en el que se demuestra que fluoxetina no modifica los efectos subjetivos producidos por MDMA en humanos. Puesto que haloperidol reduce la euforia y el estado de buen humor que produce la MDMA, también se ha implicado a la DA en los efectos psicológicos inducidos por la droga (Liechti y Vollenweider, 2000a).

3.1.B. Efectos fisiológicos.

Estos efectos incluyen aumento de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca, náuseas, escalofríos, sofocos, temblor, sudoración, sequedad de boca, hiperreflexia, incontinencia urinaria, tensión muscular, nistagmo, insomnio y dos de los más característicos: trismo (aumento de la tensión mandibular) y bruxismo (castañeteo de dientes) (McCann y col., 1996; Irvine y col., 2006). Mediante PET se ha observado que dosis de 1,7 mg/kg producen alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (Gamma y col., 2000), y también se han descrito efectos neuroendocrinos, como aumento en la concentración plasmática de prolactina y cortisol (Harris y col., 2002).

En parte, estos efectos están mediados por la liberación aguda de 5-HT, ya que el pre-tratamiento con citalopram, inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, atenúa el aumento de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca inducidos por MDMA (Liechti y Vollenweider, 2000b). Sin embargo, un estudio similar, realizado con haloperidol, concluye que el bloqueo del receptor dopaminérgico D₂ no altera las respuestas fisiológicas de la MDMA (Liechti y Vollenweider, 2000a).

No obstante, la reacción adversa más grave es la que se conoce como “*hipertermia maligna*” o “*golpe de calor*”. La MDMA incrementa la temperatura corporal, describiéndose casos en los que se alcanzaron hasta 43 °C tras la ingesta de la droga. Este aumento tan drástico en la temperatura corporal trae consigo consecuencias muy graves, como rabdomiólisis, coagulación intravascular diseminada, fallo renal agudo, e incluso, la muerte. El consumo de la droga en ambientes muy calurosos, acompañado de ejercicio intenso y continuado y de una escasa reposición de líquidos, puede potenciar el desarrollo de estos síntomas (Vollenweider y col., 1998). Otros efectos que se han descrito son taquicardia, trombocitopenia, leucocitosis tardía, acidosis, hipoglucemia, congestión pulmonar, edema y hepatitis (Simpson y Rumack, 1981; Brown y Osterloh, 1987; McCann y col., 1996; Milroy y col., 1996).

A todos estos efectos hay que añadir también alteraciones neurológicas potencialmente fatales como hemorragia subaracnoidea o intracraneal, infarto cerebral y trombosis del seno venoso cerebral, derivados de la hipertensión, vasculitis cerebral y deshidratación (Milroy y col., 1996; Ratty y Milroy, 1997).

3.2. Efectos a largo plazo.

3.2.A. Efectos psicológicos y cognitivos.

En cuanto a los efectos psicológicos a largo plazo, cabe citar alucinaciones visuales y paranoia, ansiedad, depresión, crisis de angustia y alteraciones del comportamiento (McCann y Ricaurte, 1991; McCann y col., 1994, 1996). En consumidores habituales de MDMA, se ha descrito psicosis crónica (McGuire y Fahy, 1991) y algunos casos de “flashbacks” varias semanas después de la toma del éxtasis.

Por otro lado, existen evidencias de que los consumidores de éxtasis presentan déficits cognitivos a largo plazo (Krystal y col., 1992; Parrott y col., 1998; Fox y col., 2001). Manifiestan fallos en la memoria verbal inmediata y retraso en la memoria visual (Bolla y col., 1998), así como fallos en la memoria prospectiva, (Heffernan y col., 2001). Varios trabajos han relacionado los desórdenes cognitivos con la existencia de neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la MDMA en el ser humano (McGuire, 2000; Reneman y col., 2000a; Verkes y col., 2001; Molero-Chamizo, 2005).

3.2.B. Efectos fisiológicos.

En consumidores crónicos se describen alteraciones fisiológicas a largo plazo como el síndrome de unión temporomandibular, erosión dental y dolor miofacial, como consecuencia de los efectos agudos trismo y bruxismo (McCann y col., 1996). También se han documentado casos de anemia aplásica (Marsh y col., 1994) e, incluso, hepatotoxicidad (McCann y col., 1996; Milroy y col., 1996), este último efecto tal vez mediado por los adulterantes que contienen las pastillas de éxtasis. Exámenes post-mortem han revelado la existencia de necrosis hepática y del tejido cardíaco (Milroy y col., 1996; McCann y col., 1996; Rutty y Milroy, 1997) y se ha asociado el consumo de MDMA con el desarrollo de hipertrofia cardíaca, de manera similar a lo que ocurre con cocaína y metanfetamina (Patel y col., 2005).

3.2.C. Efectos neurotóxicos.

Existen varias evidencias de que la MDMA en el ser humano, al igual que en la rata y en el mono, produce neurotoxicidad serotoninérgica. Así, estudios post-mortem de consumidores regulares de éxtasis, fallecidos por sobredosis, señalan una marcada reducción en los niveles estriatales de 5-HT y 5-HIAA (Kish y col., 2000). De la misma manera, el examen del líquido cefalorraquídeo de consumidores de éxtasis revela que estos sujetos poseen niveles más bajos de 5-HIAA con respecto a los sujetos controles. No se observan diferencias en el contenido de los metabolitos de DA y NA, HVA y 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG), respectivamente (McCann y col., 1994; 1999).

Por otro lado, estudios de PET y de tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) revelan una disminución en la densidad de transportadores de 5-HT en consumidores respecto al grupo control, que se correlaciona, además, con el grado de consumo de la droga y con el tiempo transcurrido desde el cese del consumo (McCann *y col.*, 1998; Semple *y col.*, 1999; Ricaurte *y col.*, 2000; Vollenweider *y col.*, 2002; Thomasius *y col.*, 2006). Se ha observado también mediante SPECT una regulación a la baja de receptores 5-HT_{2A} en consumidores, y una regulación al alza en abstinentes, que se justifica por la liberación masiva de 5-HT inducida por MDMA y los posteriores cambios adaptativos a la pérdida del contenido serotoninérgico (Reneman *y col.*, 2000b; Kalant, 2001).

La función serotoninérgica central también se ha evaluado en consumidores de éxtasis mediante tests neuroendocrinos: la infusión intravenosa del precursor de 5-HT, L-triptófano, conlleva un incremento en la concentración sérica de prolactina, a través del aumento en la síntesis y liberación de 5-HT. Aunque los consumidores de MDMA mostraron un aumento de prolactina tras la infusión de L-triptófano en comparación con el grupo control, las diferencias no llegaron a ser significativas, debido posiblemente al escaso número de individuos analizados (Price *y col.*, 1989). De forma similar, Gerra *y col.* (1998) demostraron que D-fenfluramina induce incrementos en los niveles de prolactina y cortisol, que son menores en el grupo de consumidores de éxtasis que en el control. Dado que la secreción de prolactina parece estar controlada por la activación de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, y la de cortisol por la estimulación de 5-HT_{2C} en presencia de un antagonista 5-HT_{1A} (Meltzer y Maes, 1995; Palazidou *y col.*, 1995), estos datos indican que las respuestas anómalas de prolactina y cortisol en consumidores de MDMA son debidas a una reducción en la sensibilidad de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} (Guerra *y col.*, 1998).

Además, se ha observado en los consumidores habituales de MDMA un número mayor de células gliales, medido por la elevación de mioinositol mediante espectroscopia de resonancia magnética protónica. Sin embargo, se detectaron niveles normales de N-acetilaspártato y glutamato/glutamina, indicando que no existe un daño permanente neuronal, tal vez porque las dosis empleadas eran muy bajas para producir daño neurotóxico, o bien porque existe una buena recuperación de la función neuronal (Chang *y col.*, 1999). No obstante, un estudio más reciente sí encuentra aumento en los niveles de N-acetilaspártato y glutamato/ glutamina (Reneman *y col.*, 2002).

También se han descrito cambios en el flujo sanguíneo cerebral, si bien parece un cambio subagudo, ya que desaparece a las 3 semanas de la ingesta de la droga (Chang *y col.*, 1999; 2000), y una disminución en el metabolismo de la glucosa, que se mantiene al menos un año desde la última ingestión (Obrocki *y col.* 1999; Buchert *y col.*, 2001).

4. Mecanismos de neurotoxicidad de la MDMA.

El mecanismo de neurotoxicidad de la MDMA sigue aún sin estar completamente esclarecido. Debido a la escasez de estudios en el ratón, la mayoría de las teorías existentes se basan en estudios realizados en rata.

4.1. Implicación de la hipertermia.

Se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la magnitud de la respuesta hipertérmica y la severidad de la neurotoxicidad a largo plazo producida por MDMA (Broening y col., 1995; Sánchez y col., 2004).

Así, por un lado, una temperatura ambiente baja (10 °C) previene la respuesta hipertérmica inducida por la droga, produciendo hipotermia en algunos casos; y, a su vez, atenúa o elimina la neurotoxicidad inducida por MDMA (Schmidt y col., 1990b; Broening y col., 1995; Darvesh y col., 2002; O'Shea y col., 2006). En este sentido, se han descrito varios compuestos neuroprotectores, como haloperidol, dizocilpina, pentobarbital o ketanserina, que deben su acción a un mecanismo inespecífico por el cual inhiben la hipertermia que origina la MDMA, o incluso provocan hipotermia (Farfel y Seiden, 1995; Malberg y col., 1996; Colado y col., 1999). El efecto neuroprotector de estos compuestos desaparece cuando, mediante el uso de una manta homeotérmica, se consigue que los animales tratados con el neuroprotector y MDMA muestren una temperatura corporal similar a los inyectados con MDMA únicamente.

Por otro lado, la administración de MDMA a elevadas temperaturas ambientales (26-33 °C) potencia la respuesta hipertérmica y produce un mayor daño neurotóxico (Broening y col., 1995; Sánchez y col., 2004).

Sin embargo, aunque la hipertermia contribuye en gran medida a la neurotoxicidad de la MDMA, no es un factor imprescindible, ya que se ha observado que la MDMA es capaz de producir neurotoxicidad en ausencia de respuesta hipertérmica. Así, dosis bajas y repetidas de MDMA (4 mg/kg, 2 veces/día durante 4 días) provocan efectos neurotóxicos en ratas Dark Agouti sin modificar la temperatura rectal de los animales (O'Shea y col., 1998). Se ha observado incluso toxicidad serotoninérgica en ausencia de hipertermia con altas dosis de MDMA (Broening y col., 1995).

Además, la hipertermia *per se* no es el mecanismo de neurotoxicidad de la MDMA, ya que se han encontrado compuestos neuroprotectores frente a la neurotoxicidad de la droga que no modifican la temperatura corporal. Entre estos se encuentran fluoxetina (Sánchez y col., 2001), PBN (Colado y col., 1997a) o clometiazol, que protege parcialmente e independientemente de sus efectos sobre la temperatura corporal (Colado y col., 1999b).

4.2. Implicación del estrés oxidativo y los radicales libres de oxígeno.

Hasta el momento, la teoría de la implicación del estrés oxidativo y de los radicales libres de oxígeno en la neurotoxicidad inducida por MDMA es la que toma mayor fuerza. Como ya se ha comentado, la MDMA aumenta la formación de radicales libres de oxígeno e induce peroxidación lipídica, tanto en la rata como en el ratón. Pero además, existen evidencias que implican a estos radicales libres en la neurotoxicidad a largo plazo inducida por la droga, como se describe a continuación.

En primer lugar, el atrapador de radicales libres PBN (α -fenil-*N*-terbutil nitrona) atenúa el daño neurotóxico que produce MDMA, sin alterar la hipertermia (Colado y Green, 1995; Yeh y *col.*, 1999; Capela y *col.*, 2006). Otros compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico o L-cisteína (Gudelsky y *col.*, 1996), así como el antioxidante metabólico ácido α -lipoico (Aguirre y *col.*, 1999), también protegen frente a la neurotoxicidad que induce la droga.

En segundo lugar, se ha demostrado que ratones transgénicos que sobreexpresan la superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra disminuida en cerebro de ratón tras la administración de MDMA, son resistentes al daño neuronal producido por la droga (Cadet y *col.*, 1995).

En tercer lugar, la disminución de la capacidad antioxidante, mediante la administración de una dieta deficiente en vitamina E o selenio (agentes antioxidantes), potencia la neurotoxicidad dopaminérgica que produce MDMA en el ratón (Johnson y *col.*, 2002; Sanchez y *col.*, 2003). Con la dieta deficiente en selenio aparece incluso toxicidad serotoninérgica en el ratón. Este efecto parece ser debido a una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa, que conduce a un aumento del grado de peroxidación lipídica cerebral (Sanchez y *col.*, 2003). No obstante, el déficit de selenio no modifica la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA en la rata, pese a que disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa.

La procedencia de estos radicales libres todavía no se ha identificado exactamente, existiendo evidencias que sugieren diferentes orígenes: 1) del metabolismo de la MDMA, mediante la formación de quinonas y otras especies reactivas (Hiramatsu y *col.*, 1990; Tucker y *col.*, 1994; Colado y *col.*, 1997b; Esteban y *col.*, 2001); y 2) del metabolismo de la DA dentro del terminal serotoninérgico por la MAO B, dando lugar a peróxido de hidrógeno y radicales libres (Sprague y *col.*, 1998; Shankaran y *col.*, 1999b; Falk y *col.*, 2002).

Por otro lado, no sólo los radicales libres de oxígeno, sino también los de nitrógeno, como el óxido nítrico y el peroxinitrito, podrían estar implicados en el mecanismo de neurotoxicidad (ver apartado 4.6).

4.3. Implicación de 5-HT, sus metabolitos y el sistema de transporte de 5-HT.

Se ha implicado al sistema serotoninérgico en la neurotoxicidad inducida por MDMA, ya que el tratamiento con fluoxetina, inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, previene completamente los efectos neurotóxicos de la droga (Schmidt y col., 1987a; Sánchez y col., 2001) y reduce el aumento en la formación de radicales hidroxilo (Shankaran y col., 1999b).

Además, otros estudios sugieren que los receptores 5-HT_{2A} también podrían participar en dicha neurotoxicidad, a través de cambios en la homeostasis del calcio (Park y Azmitia, 1991) o mediante la translocación y activación de PKC (Kramer y col., 1995), ya que antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} atenúan la neurotoxicidad inducida por MDMA (Nash y col., 1990; Schmidt y col., 1990a). Sin embargo, dichos antagonistas bloquean también la hipertermia que induce la droga y reducen la liberación de DA (Nash y col., 1990; Schmidt y col., 1990a), por lo que es posible que la DA también esté implicada en el efecto tóxico de la MDMA. La implicación de los receptores 5-HT_{2A} en la neurotoxicidad de la MDMA también se ha demostrado recientemente en cultivos neuronales (Capela y col., 2006b).

Por otro lado, el metabolismo de 5-HT da lugar a 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y 5,7-DHT (Wrona y Dryhurst, 1991), ambos potentes neurotoxinas para el sistema serotoninérgico (Baumgarten y col., 1981; Schmidt y Kehne, 1990), por lo que podrían ser causa de los efectos neurotóxicos inducidos por la droga, dado que la MDMA incrementa la liberación de 5-HT de manera inmediata. Sin embargo, esta teoría no parece probable puesto que el perfil neurotóxico de estos metabolitos no coincide con el de la MDMA, ya que dichos compuestos afectan a los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas (Baumgarten y col., 1981), mientras que MDMA solamente afecta a los terminales (Battaglia y col., 1991; Lew y col., 1996), y además, estos metabolitos no se han detectado en el cerebro de animales de experimentación. Por otro lado, precursores de la síntesis de 5-HT, 5-hidroxitriptófano o L-triptófano, atenúan la neurotoxicidad inducida por MDMA, en lugar de inducirla (Sprague y col., 1994; Gudelsky y Nash, 1996).

Según estos datos, la implicación del sistema serotoninérgico en la neurotoxicidad inducida por MDMA se reduce a la activación del sistema de transporte de 5-HT y de los receptores 5-HT_{2A}, no estando implicados la propia 5-HT ni sus metabolitos.

4.4. Implicación del sistema de DA.

Se ha intentado correlacionar también la liberación aguda de DA que induce la MDMA con la gravedad del daño serotoninérgico a largo plazo (Nash y Brodtkin, 1991). Son varios los estudios que implican a la DA en la neurotoxicidad provocada por la droga.

Por un lado, el pretratamiento con L-DOPA, precursor de la síntesis de DA, potencia la toxicidad de la droga (Schmidt y col., 1990) y hace que aparezca daño en neonatos, donde la MDMA

no es capaz de producir neurotoxicidad por sí misma (Aguirre y col., 1998b). Sin embargo, Colado y col. (1999c) no observaron mayor neurotoxicidad con L-DOPA, tal vez por la diferencia de dosis empleada.

Por otro lado, la atenuación de la liberación de DA mediante la destrucción de terminales dopaminérgicos con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), o la inhibición de su síntesis con AMPT, protege frente al daño inducido por MDMA. También proporcionan protección antagonistas de receptores dopaminérgicos como haloperidol (Schmidt y col., 1990; Aguirre y col., 1998b). No obstante, hay que considerar que tanto haloperidol como AMPT producen hipotermia cuando se administran junto con MDMA y sus efectos neuroprotectores desaparecen si se reproduce la hipertermia de la MDMA (Malberg y col., 1996; Colado y col., 1999c; Yuan y col., 2002).

Además, la inhibición de la recaptación de DA mediante compuestos como GBR12,909 o mazindol (Stone y col., 1988; Shankaran y col., 1999a), o mediante la infusión del oligonucleótido antisentido del transportador de DA (Kanthasamy y col., 2002), también previene la disminución de la concentración de 5-HT que induce la MDMA. Sin embargo, el mazindol inhibe también los sistemas de transporte de 5-HT y NA (Heikkila y col., 1977), por lo que su efecto no se puede atribuir únicamente a la inhibición del transportador de DA.

También se ha visto que la disminución del metabolismo de DA mediante la inhibición de la expresión de la MAO-B, por perfusión del oligonucleótido antisentido o por la administración de L-deprenilo, inhibidor de la MAO-B, previene la neurotoxicidad de la droga (Sprague y Nichols, 1995; Falk y col., 2002). No obstante, mientras que el efecto de la perfusión del oligonucleótido se puede considerar específico, dado que no afecta a la hipertermia ni a la liberación de DA producida por la droga, el L-deprenilo puede prevenir el daño por su actividad como atrapador de radicales. Sin embargo, se ha demostrado en ratones que un déficit en la enzima MAO-B produce mayor daño neurotóxico (Fornai y col., 2001).

Las diversas teorías que señalan a la DA como agente causante de la toxicidad de la droga no concuerdan bien con el hecho de que la MDMA produce daño neuronal en estructuras cerebrales con poca inervación dopaminérgica, como el hipocampo. La mayor parte de los datos sugieren la implicación del estrés oxidativo en el mecanismo de neurotoxicidad (Cadet y col., 1995; 2001). La teoría que se propone para integrar la DA en el mecanismo de neurotoxicidad de la MDMA es que la MDMA, a través de la inhibición de la MAO, provoca un aumento en los niveles de DA extracelular, que es recaptada al interior del terminal serotoninérgico a través del transportador de 5-HT, donde se metaboliza, produciendo un aumento de radicales libres de oxígeno y estrés oxidativo (Sprague y col., 1995; 1998; Hrometz y col., 2004).

4.5. Implicación de un metabolito tóxico de la MDMA.

El metabolismo de la MDMA se ha estudiado ampliamente *in vivo* e *in vitro* en varias especies animales, siendo de particular interés por la posible implicación de algunos de sus metabolitos en sus acciones farmacológicas y neurotóxicas. En la rata, la MDMA sufre metabolismo hepático y forma metilendioxianfetamina (MDA), por N-desmetilación, y 3,4-dihidroximetanfetamina (N-metil- α -metildopamina, HHMA), su principal metabolito, por O-desmetilación. Posteriormente, la MDA se convierte en 3,4-dihidroxianfetamina (α -metildopamina, α -MeDA, HHA) por O-desmetilación. HHMA y HHA son catecoles altamente inestables y por ello son rápidamente oxidados a sus correspondientes ortoquinonas, formando aductos con el glutatión y otros componentes tiólicos (Lim y Foltz, 1988; Hiramatsu y col., 1990). Adicionalmente, HHMA y HHA sufren metabolismo por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para formar 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) y 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina (HMA), respectivamente. En general, el metabolismo de la MDMA es muy complejo y se han aislado 14 metabolitos de esta droga *in vivo* (Lim y Foltz, 1988; 1991a, b), algunos de los cuales podrían estar implicados en la neurotoxicidad inducida por la MDMA (de la Torre y col., 2004).

Esteban y col. (2001) no observaron neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo al perfundir MDMA directamente en el hipocampo de la rata a concentraciones similares a las alcanzadas en cerebro tras la administración i.p. de una dosis neurotóxica de MDMA (O'Shea y col., 1998). Otros autores tampoco han sido capaces de reproducir los efectos neurotóxicos de la droga al administrarla directamente en el cerebro (McCann y Ricaurte, 1991; Paris y Cunningham, 1992; Nixdorf y col., 2001). Además, la inhibición del citocromo P450 atenúa la neurotoxicidad de la droga, mientras que su estimulación potencia el metabolismo y la neurotoxicidad (Gollamudi y col., 1989). Con todo esto, es probable que la MDMA requiera sufrir metabolismo hepático para producir neurotoxicidad (Esteban y col., 2001).

Son muchos los trabajos que han intentado esclarecer cuál de los metabolitos de la MDMA podría ser el responsable de los efectos tóxicos de la droga en el cerebro, sin llegar a conclusiones firmes: algunos de ellos no son neurotóxicos, otros poseen un perfil neurotóxico diferente al de la MDMA, y otros no se han identificado en el cerebro de la rata tras la administración de la droga. Así, la inyección directa a nivel central de MDA (Molliver y col., 1986) o de su metabolito HMA (McKenna y Peroutka, 1990) no reproduce los efectos neurotóxicos serotoninérgicos que produce la droga vía intraperitoneal. Tampoco lo hace la administración intracerebral del principal metabolito hepático de la MDMA, el HHMA (McKenna y Peroutka, 1990; Escobedo y col., 2005). Sí lo hacen algunos derivados del glutatión como el 2,5-bis-(glutatión-S-yl)- α -metildopamina (Miller y col., 1995), el 5-(glutatión-S-yl)- α -metildopamina (Bai y col., 1999), el 5-(N-acetilcistein-S-yl)- α -metildopamina y el (N-acetilcistein-S-yl)-N-metil- α -metildopamina (Jones y col., 2005).

En el ratón existen menos estudios sobre el metabolismo de la MDMA, pero los datos disponibles indican que, al igual que en la rata, es necesario el metabolismo periférico de la droga para que se manifieste la toxicidad dopaminérgica de la MDMA (Escobedo y *col.*, 2005).

El mecanismo por el cual los metabolitos de la MDMA participan en la neurotoxicidad parece ser a través de la generación de especies reactivas que inactivan a la TPH y causan daño a los componentes proteicos y lipídicos del terminal nervioso. Catecoles, quinonas e hidroquinonas pueden sufrir oxidación espontánea generando anión superóxido y peróxido de hidrógeno, que pueden provocar peroxidación lipídica y daño al terminal serotoninérgico como consecuencia de la formación de radicales hidroxilo (Lyles y Cadet, 2003). Además, Capela y *col.* (2006) observaron que la neurotoxicidad de los metabolitos de MDMA se atenúa mediante la administración de antioxidantes, como la N-acetilcisteína, y de PBN.

Recientemente, Milhazes y *col.* (2006) han demostrado también que los radicales libres juegan un papel importante en la citotoxicidad de los metabolitos de la MDMA y han observado que los metabolitos que poseen grupos catecoles son más citotóxicos que la propia MDMA y que los metabolitos con al menos un grupo fenólico protegido.

4.6. Implicación del glutamato y del óxido nítrico.

Se ha sugerido que el glutamato y el óxido nítrico (NO) podrían participar en el mecanismo de neurotoxicidad de la MDMA, dado que se han implicado en otros procesos neurotóxicos, como es el caso de la neurotoxicidad inducida por un derivado anfetamínico similar a la MDMA, la metanfetamina (Battaglia y *col.*, 2002).

La MDMA no afecta a la liberación de glutamato en el estriado a dosis neurotóxicas (Nash y Yamamoto, 1992; Sprague y *col.* 1998). Sin embargo, la administración local de MDMA en el núcleo accumbens provoca un descenso en la liberación de glutamato debido a interacciones entre los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico (White y *col.*, 1994; Obradovic y *col.*, 1996).

La implicación del glutamato en la neurotoxicidad de la MDMA no está muy clara. El bloqueo de los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) con el antagonista MK-801 protege frente a la disminución de 5-HT que provoca la droga (Farfel y *col.*, 1992; Colado y *col.*, 1993), si bien este efecto parece deberse a la hipotermia que produce el compuesto (Farfel y Seiden, 1995; Colado y *col.*, 2001). Otros antagonistas de receptores de glutamato, como CGS19755 (Farfel y *col.*, 1995) y AR-R15896AR (Colado y *col.*, 1998) no ejercen protección frente al daño inducido por MDMA.

En cuanto a la implicación del NO en la neurotoxicidad de la MDMA, parece ser diferente en la rata y en el ratón.

En la rata, existen datos contradictorios. Por un lado, se han estudiado diversos inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS), como N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N(G)-monometil-

L-arginina y N(G)-nitro-L-arginina, resultando efectivo como neuroprotector solamente L-NAME, si bien este efecto de L-NAME parece ser debido a su capacidad para producir hipotermia y no a la inhibición que ejerce sobre la actividad de la NOS (Taraska y Finnegan, 1997). Sin embargo, el pretratamiento con el inhibidor de la NOS, N- ω -nitro-L-arginina (L-NOARG), provoca una protección parcial de la pérdida de 5-HT en la corteza a largo plazo, estructura en la cual la actividad de la NOS está significativamente elevada 6 h tras la administración de la MDMA. Este compuesto no afecta ni a la liberación aguda de neurotransmisores ni a la hipertermia inducida por la droga (Zheng y *col.*, 1998). Por otro lado, la MDMA causa muerte neuronal en cultivos de células humanas serotoninérgicas, que se previene mediante tratamiento con L-NAME (Simantov y *col.*, 1997).

Recientemente, se ha vuelto a implicar al NO en la neurotoxicidad de la MDMA al demostrar que la administración del inhibidor de la NOS, S-metil-tiocitrulina (S-MTC), atenúa la depleción de 5-HT en el estriado producida por la administración sistémica de MDMA, sin modificar la hipertermia de la droga (Darvesh y *col.*, 2005).

Sin embargo, en el ratón parece ser que el NO sí participa en la toxicidad dopaminérgica, ya que la administración de MDMA en esta especie junto con varios inhibidores de la NOS, como 7-nitroindazol (7-NI), S-metil-tio-citrulina (S-MTC) y AR-R17477AR, origina neuroprotección (Colado y *col.*, 2001b), y sólo 7-NI produce hipotermia. Además, el compuesto AR-R17477AR disminuye la formación de radicales libres en el estriado del ratón tras MDMA (Colado y *col.* 2001b), lo cual sugiere, de nuevo, que los radicales libres de oxígeno desempeñan un papel muy relevante. Sin embargo, la implicación del NO no parece ser debida a un aumento en la concentración de glutamato, ya que ni MK-801 ni AR-R15896AR, antagonistas del receptor NMDA, protegen frente a la neurotoxicidad dopaminérgica de la MDMA en el ratón (Colado y *col.*, 2001b).

4.7. Implicación del equilibrio energético.

La MDMA afecta al equilibrio energético provocando una inhibición irreversible del complejo mitocondrial IV (Burrows y *col.*, 2000), así como una disminución en la concentración de ATP en el hipocampo y estriado de rata (Darvesh y Gudelsky, 2005). Por otro lado, la continua reversión de los transportadores de 5-HT y DA por acción de la MDMA, podría aumentar la concentración de Na⁺ intracelular y activar la ATPasa dependiente de Na⁺/K⁺, lo que ocasionaría el agotamiento de los depósitos energéticos (Zeevalk y Nicklas, 1996). Además, se ha demostrado también, en cultivos de astrogliá, que MDMA incrementa la actividad de la enzima que degrada el glucógeno, la glucógeno fosforilasa, promoviendo así la glucogenolisis y la pérdida de las reservas energéticas (Poblete y Azmitia, 1995). Similares resultados obtuvieron Darvesh y *col.* (2002), quienes observaron que la administración de una dosis única de MDMA provoca un incremento de la glucogenolisis y una elevación de la concentración de glucosa en el estriado.

Existen evidencias de que la alteración del metabolismo energético puede contribuir a la neurotoxicidad inducida por MDMA. Así, la administración intraestriatal de MDMA junto con malonato (inhibidor de la succinato deshidrogenasa) exagera la disminución de los niveles de DA y 5-HT en estriado, sugiriendo la participación del estrés bioenergético en estos efectos (Nixdorf y *col.*, 2001).

Por otro lado, la perfusión de nicotinamida y ubiquinona, sustratos energéticos que aumentan la producción de ATP, atenúan la depleción de 5-HT en el hipocampo y estriado producida por la administración de MDMA (Darvesh y Gudeslky, 2005).

Sección 2: Etanol.

5. ETANOL.

5.1. Aspectos generales.

El etanol es el principal componente de las bebidas alcohólicas. El consumo de dichas bebidas es un hábito muy extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de las sociedades occidentales. Actualmente, beber alcohol no es un hábito exclusivo de la población adulta, sino que los jóvenes también lo hacen y cada día son más los adolescentes que acostumbran a hacerlo, especialmente durante el tiempo que dedican al ocio durante el fin de semana.

Hoy en día, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha tratado como una alarma «*la magnitud de los problemas de salud pública asociados al consumo de alcohol*» y ha enfatizado su preocupación ante «*las tendencias de consumo que se observan entre las capas más jóvenes de la sociedad*».

5.2. Estructura química del etanol.

El etanol, también conocido como alcohol etílico o, simplemente, alcohol, se presenta como un líquido claro, incoloro, volátil, inflamable, de infinita solubilidad en agua y miscible en cloroformo y éter. Su fórmula empírica es C_2H_6O y su estructura molecular y tridimensional es la que se representa en la figura 4.

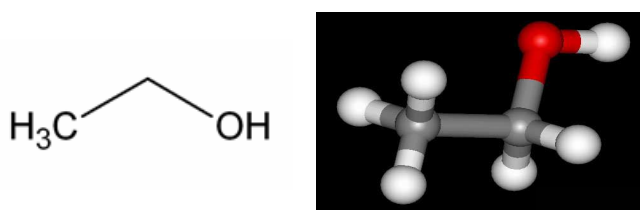


Figura 4. Estructura molecular y tridimensional del etanol.

El etanol es un alcohol primario debido a que el hidrógeno sustituido por el grupo hidroxilo pertenece a un carbono primario. Posee un enlace O–H, muy polar, de manera que el átomo de hidrógeno forma puentes con otros átomos de oxígeno de moléculas vecinas, confiriéndole a la molécula de etanol una gran polaridad. Esto, junto con su corta cadena de alcanos, hace que el etanol sea muy soluble en agua, siendo su hidrosolubilidad 30 veces mayor que su liposolubilidad.

5.3. Definición y clasificación de las bebidas alcohólicas.

Se entiende por bebida alcohólica aquella en cuya composición está presente el etanol en forma natural o adquirida, y cuya concentración es igual o superior al 1 % de su volumen.

Existen dos tipos de bebidas alcohólicas, las *bebidas fermentadas* (vino, cerveza, sidra, etc.), procedentes de frutas o cereales que, por acción de ciertas levaduras, el azúcar que contiene se convierte en alcohol, en un proceso conocido como fermentación anaeróbica o alcohólica; y las *bebidas destiladas* (coñac, ginebra, ron, whisky, etc.), que se obtienen eliminando mediante calor, a través de la destilación, una parte del agua contenida en las bebidas fermentadas, de manera que tienen más alcohol que éstas últimas.

Las diversas presentaciones de las bebidas alcohólicas están obligadas por ley a indicar en el envase correspondiente la graduación alcohólica. Dicha graduación se expresa en grados y mide el contenido de alcohol absoluto en 100 cc, es decir, el porcentaje de alcohol puro que contiene una bebida. Viene expresado en los envases como (°) o vol%.

Sin embargo, desde la perspectiva sanitaria, tiene mayor relevancia determinar los gramos de etanol absoluto ingerido, no el volumen de bebida alcohólica. Para calcular el contenido en gramos de una bebida alcohólica basta con multiplicar el volumen ingerido por los grados de la misma y por la densidad del etanol (0,79 g/mL). La fórmula es:

$$\text{gramos alcohol} = \frac{\text{volumen (expresado en c.c.)} \times \text{graduación} \times 0,79}{100}$$

No obstante, en los últimos años, esta forma de calcular los gramos de alcohol se ha sustituido por el concepto de *Unidad de Bebida Estándar* (UBE). En España una unidad de bebida es igual a 10 gramos de etanol puro (Saunders y col., 1993).

5.4. Historia y situación actual del consumo de alcohol.

El etanol es la droga más antigua que se conoce. El uso y abuso de bebidas alcohólicas así como sus propiedades euforizantes, desinhibitorias y depresoras del SNC se conocen desde las épocas más remotas de la Humanidad y, en algunos casos, está asociado a ciertas tradiciones, leyendas y leyes de diferentes culturas.

Ya en el Paleolítico se producía *hidromiel*, producto de contenido alcohólico producido por fermentación de la miel. En Babilonia, en la época antes de Cristo, se elaboraba el *Shiraku*, a base de cebada y semejante a la cerveza actual. Los griegos ofrecían bebidas alcohólicas a sus dioses y a los soldados antes de los combates. Los romanos difundieron el vino por toda Europa, promulgando leyes sobre su cultivo y comercio. Los árabes descubrieron la destilación y la introdujeron en Europa. Durante la Edad Media, el consumo de alcohol se asoció a salud y bienestar, conociéndole con el

apelativo “*aqua vitae*”. La Revolución Industrial hizo que su consumo aumentara, incluso hasta el abuso.

Actualmente, el alcohol ha perdido gran parte de las características tradicionales que lo asociaban a la alimentación y, en la cultura actual, predomina su uso asociado a la diversión. De esta manera, el consumo de alcohol se realiza casi exclusivamente por sus efectos psicoactivos. Estas características hacen del alcohol la droga social por excelencia.

5.4.1. Situación actual del consumo en España.

España es uno de los países donde el consumo de bebidas alcohólicas y los problemas relacionados con el mismo tienen más importancia. Es el tercer productor mundial de alcohol, tras Francia e Italia, y es uno de los primeros países consumidores. En el año 2003, España ocupaba el sexto lugar en el ‘ranking’ de consumo mundial de alcohol. No obstante, al igual que ha ocurrido en otros países del Sur de Europa, el consumo de bebidas alcohólicas ha disminuido de manera notable en los últimos años.

Datos obtenidos de la última encuesta domiciliaria del Plan Nacional sobre Drogas (2005-2006) indican que el 93,7 % de la población española con una edad comprendida entre 15 y 64 años, ha probado alguna vez en su vida alguna bebida alcohólica, más de las tres cuartas partes (76,7 %) ha bebido alcohol en el último año, casi el 65 % lo ha hecho en el último mes y el 15 % lo hace diariamente. Esto señala la elevada prevalencia del consumo de alcohol en nuestro país y el arraigo social de este hábito que, entre nosotros, ha adquirido visos de completa normalidad.

Por edad, la prevalencia de consumo en los últimos 12 meses es máxima entre los 15 y los 24 años (80 %), descendiendo ligeramente con la edad, hasta los 55-64 años (68,6 %).

Sin embargo, hay que destacar que los patrones de uso, y también los de abuso, del alcohol han variado de forma muy importante en España. Los cambios económicos, sociales y culturales han hecho que abandonemos el viejo “patrón mediterráneo”, que limitaba la ingesta de alcohol a tan sólo pequeñas cantidades de vino en las comidas que se realizaban en familia, reservadas a adultos. Ahora, el inicio en el consumo de alcohol se produce, de manera cada vez más frecuente, en el grupo de amigos y compañeros a edades muy tempranas. Así, en España, son muchos los jóvenes y adolescentes que beben. En el año 2004, el 81 % de los estudiantes de 14 a 18 años lo había hecho en el último año, el 65,5 % había bebido alcohol en el último mes, una mayoría se había emborrachado alguna vez en la vida y más del 30 % lo había hecho en el último mes (ver apartado 1.4.3.).

5.4.2. Tipologías del consumo de alcohol.

La tipología o el patrón de consumo está en relación con la cantidad y la frecuencia con la que se distribuye a lo largo del tiempo. Se identifican 4 patrones de consumo: Consumo no problemático, de riesgo, peligroso o problemático y perjudicial.

Aunque no es frecuente hablar del bebedor normal, ya que podría traducirse como que lo razonable es beber, es necesario que se establezcan criterios que ayuden a distinguir este tipo de consumo. El bebedor no problemático es el que cumple los siguientes criterios:

1. Ser mayor de 18 años.
2. Si es mujer, no estar embarazada ni en periodo de lactancia.
3. Estado nutricional adecuado.
4. Bebidas ingeridas aprobadas por las autoridades sanitarias.
5. No presentar embriaguez atípica.
6. Consumir alcohol sin consecuencias negativas para uno mismo ni para otros.
7. No presentar problemas familiares o laborales debidos al consumo.
8. No depender del alcohol para sentirse más alegre o para comunicarse más fácilmente.
9. No presentar patologías que se agraven o descompensen con el alcohol.
10. No embriagarse.

El consumo de riesgo es un concepto difícil de consensuar al depender del tipo de consecuencia que se esté evaluando para establecer el riesgo. Así, no se puede aplicar el mismo criterio para la conducción de vehículos que para la patología cardiovascular. La OMS clasifica como bebedor de riesgo a aquel que consume 28 UBEs/semana en el caso de los varones y 17 UBEs/semana en las mujeres. También se considera bebedor de riesgo aquella persona que consume gran cantidad de alcohol en una sola ocasión o en un periodo corto de tiempo, al menos una vez al mes (*atración* o '*binge drinking*'). Además, cualquier consumo de alcohol en menores se considera un consumo de riesgo (Andersen y Baumberg, 2006).

Se denomina consumo peligroso o problemático cuando el bebedor ha padecido o padece algún problema relacionado con el alcohol, como haber conducido bajo sus efectos o presentar complicaciones médicas, familiares o conductuales. Y se considera consumo perjudicial, el realizado por una persona que, independientemente de la cantidad consumida de alcohol, presenta problemas físicos o psicológicos como consecuencia del mismo.

5.4.3. Patrón de consumo juvenil: consumo de fin de semana.

Como ya se ha comentado, se han producido cambios en los patrones de consumo de alcohol y uno de esos cambios es la incorporación generalizada de los adolescentes y jóvenes de edades muy tempranas al consumo de alcohol. Hoy en día, el consumo juvenil presenta unas

características propias que han generado una “cultura del consumo de alcohol” diferenciada del consumo tradicional. Así, progresivamente se va consolidando un patrón juvenil de consumo de alcohol, caracterizado por acontecer en el fin de semana, por la búsqueda intencionada de la embriaguez y por su papel fundamental como articulador del ocio y de las relaciones sociales de los adolescentes.

Entre los jóvenes se ha extendido la costumbre de beber grandes cantidades de alcohol, siendo cada vez más frecuentes consumos muy elevados en cortos periodos de tiempo, dando lugar a un patrón de consumo denominado en inglés “*binge drinking*”, y entre nosotros “*atracón*”, que se encuentra generalizado en muchos países de nuestro entorno, y que da lugar a intoxicaciones agudas graves (incluso estados de coma etílico) en menores de 18 años. El actual fenómeno del “botellón”, así como la frecuencia de las salidas nocturnas y el horario de regreso a casa, son aspectos íntimamente relacionados con el consumo abusivo y las borracheras.

6. Metabolismo del etanol.

6.1. Metabolismo periférico del etanol.

El metabolismo del etanol es constante en el tiempo e independiente de su concentración en sangre (cinética de orden cero). En un adulto sano, la velocidad de metabolización es de unos 120 mg/kg/hora. Cuando se supera esta cantidad, el sistema se satura y ello implica que el alcohol se acumula al no poder metabolizarse.

Dicho metabolismo se produce casi exclusivamente por un proceso de oxidación que se da principalmente en el hígado, mediado por la alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH), enzima de tipo metaloproteína que utiliza el NAD como receptor de H^+ . Así, el alcohol es metabolizado enzimáticamente, primero por la ADH a acetaldehído (Petersen, 1983), y después, por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) a acetato (Lieber, 1977; Ehrig y *col.*, 1990) (figura 5), el cual es oxidado en el ciclo del ácido cítrico o se utiliza en las diversas reacciones anabólicas que intervienen en la síntesis de colesterol, ácidos grasos u otros constituyentes de los tejidos.

Pero además, una pequeña porción del etanol puede ser metabolizado por rutas alternativas, como el sistema de oxidación microsomal (MEOS), dependiente del citocromo P-450 isoenzima 2E1 (CYP450 2E1), y la vía de la catalasa (Lieber, 1977; Zimatkin y *col.*, 1997) (figura 5). El MEOS y la catalasa tienen valores para la constante de Michaelis (Km) mayores que la ADH, por eso sólo llegan a ejercer una acción significativa a niveles elevados de etanol, cuando la ADH está inhibida o, en el caso del MEOS, tras el consumo crónico de etanol, ya que dicho consumo induce este sistema (Zimatkin y *col.*, 1997).

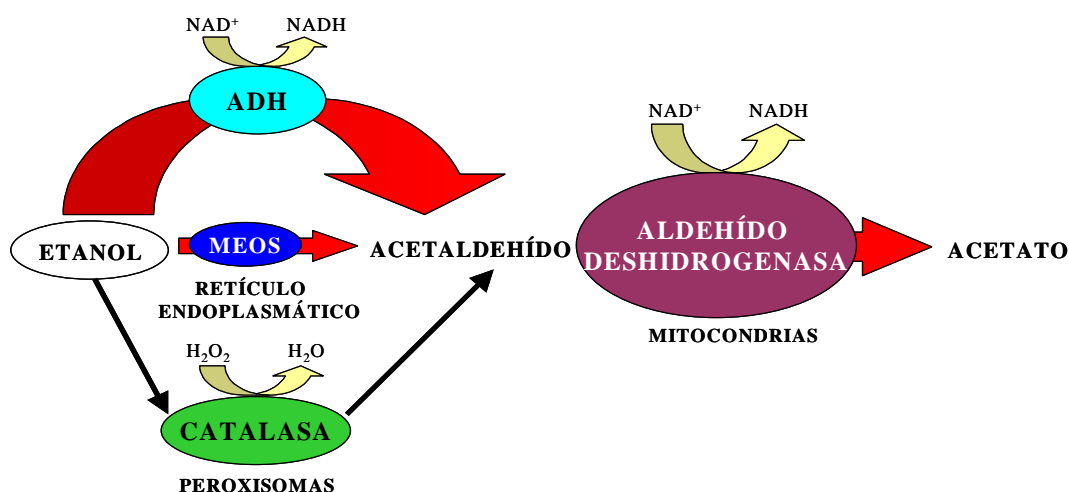


Figura 5. Metabolismo del etanol. ADH: alcohol deshidrogenasa; MEOS: sistema de oxidación microsomal

Alrededor de un 2 % (que se puede elevar hasta el 10 % en grandes ingestas), escapa a la oxidación, eliminándose entonces a través de la orina y el aire espirado, aunque también pueden detectarse pequeñas cantidades de etanol en el sudor, las lágrimas, las bilis, el jugo gástrico, la saliva y otras secreciones (Rubin y Lieber, 1967; Lieber y *col.*, 1975; Teschke y *col.*, 1977; Ueno y *col.*, 1990).

6.2. Metabolismo central del etanol.

Como ya se ha expuesto, la oxidación del etanol se produce en dos etapas y acontece principalmente en el hígado. Sin embargo, existe la posibilidad de que, junto al periférico, exista un metabolismo cerebral del etanol. Esta posibilidad queda sustentada por la demostración de la existencia, en el SNC, de los diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el etanol.

No obstante, el mapa enzimático en el cerebro es menos conocido que en el hígado y parece ser un tanto diferente. De hecho, la importancia relativa de los sistemas enzimáticos parece variar notablemente en el cerebro en relación al hígado. Así, la ADH clase I, que en el hígado es la principal enzima oxidante del etanol a concentraciones bajas y moderadas, posee una actuación muy limitada en el SNC (Raskin y Sokoloff, 1972).

La presencia de la actividad específica de la ADH en el cerebro fue demostrada por primera vez por Raskin y Sokoloff (1968). Más tarde, estudios inmunohistoquímicos permitieron detectar dicha enzima en el citoplasma de algunas neuronas de la corteza cerebral, del hipotálamo, del tallo infundibular de la pituitaria y en el cerebelo (Bühler y *col.*, 1983; Kerr y *col.*, 1989). Así, la localización de esta enzima está limitada al citoplasma neuronal y solo para algunas neuronas, lo que puede

indicar que su actividad a nivel global sea baja. Además, en el cerebro humano y de roedores, la isoforma más abundante de esta enzima es la ADH clase III (Rout, 1992), que presenta una afinidad muy baja por el etanol, y como consecuencia, las oportunidades para la oxidación del etanol son bastante limitadas (K_m mayor de 2,5 M). De hecho, esta concentración (2,5 M) no se puede alcanzar en el cerebro ni siquiera bajo una intoxicación severa con etanol (Giri y col., 1989).

También se ha descrito la presencia en cerebro de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS. La presencia de CYP450 en cerebro fue observada por primera vez por Sasame y col. (1977), si bien, estudios inmunohistoquímicos ponen de manifiesto la presencia de un alto número de isoformas del CYP450 en varias regiones del cerebro (Warner y col., 1993). En concreto, el citocromo CYP450 2E1, isoenzima relacionada más directamente con el metabolismo del etanol, fue identificada en el cerebro por Morgan y col. (1982) y se ha demostrado que es inducida por etanol, como ocurre en el hígado (Warner y Gustafsson, 1994; Tindberg e Ingelman-Sundberg, 1996).

Finalmente, existe un gran número de estudios que demuestran que el sistema de la catalasa se halla presente y activo en el SNC (Aragon y col., 1992a; Gill y col., 1992; Reddy y col., 1995; Eysseric y col., 1997; Hamby-Mason y col., 1997; Zimatkin y col., 1998). Varios estudios han postulado un papel central para la catalasa en la mediación de la oxidación del etanol en el cerebro. Así, Tampier y Mardones (1979) observaron, en homogenados cerebrales de rata, que la adición al medio de un inhibidor de dicha enzima, como la azida sódica o el aminotriazol, reduce la oxidación del etanol alrededor de un 50 % respecto a los controles. Estudios posteriores han confirmado estos resultados y además no han encontrado evidencia de la participación de la ADH o del CYP450 en el metabolismo cerebral del etanol, ya que inhibidores de ambos sistemas no influyen en la formación de acetaldehído desde el etanol (Aragon y col., 1991; Gill y col., 1992). Además, la formación de acetaldehído incrementa cuando se añade al medio directamente peróxido de hidrógeno exógeno o un sistema generador de peróxido (Aragon y col., 1992).

No obstante, muy recientemente, Zimatkin y col. (2006) intentaron determinar la contribución de los diferentes sistemas enzimáticos en la oxidación del etanol en homogenados cerebrales de rata y ratones, mediante la utilización tanto de inhibidores enzimáticos como ratones genéticamente deficientes en las enzimas metabolizantes del etanol. Observaron que la catalasa es la enzima clave en la oxidación del etanol en el cerebro y que la CYP2E1 juega un importante papel, mientras que la ADH apenas está implicada en dicho proceso. Además, determinaron la oxidación del etanol en diversas fracciones subcelulares cerebrales conocidas por presentar diferentes actividades de dichas enzimas, encontrando que los niveles de oxidación del etanol más altos se producen en los microsomas y peroxisomas, fracciones subcelulares donde se localizan la catalasa y el CYP2E1.

7. Neurobiología de la adicción al alcohol.

La adicción al alcohol aparece tras el consumo crónico de cantidades abusivas de alcohol. La conducta adictiva asociada al alcoholismo se caracteriza por la compulsión en la obtención del etanol, la pérdida de control del consumo y el desarrollo de tolerancia y dependencia. Al igual que en otras adicciones, el alcoholismo se caracteriza también por la vulnerabilidad crónica a las recaídas tras el cese del consumo de la droga.

7.1. Tolerancia al alcohol.

La *tolerancia* se define como la necesidad de beber cada vez más cantidad de etanol para conseguir los mismos efectos que aparecían inicialmente. Si no se aumenta la cantidad, disminuyen los efectos del etanol. Se produce por la adaptación del organismo a la presencia continuada de alcohol.

El sujeto puede interpretar erróneamente la tolerancia como que es más resistente y “aguanta” mejor el alcohol porque, a pesar de que bebe bastante, no se emborracha y no le afecta aparentemente en su comportamiento, cuando en realidad significa que ya se han puesto en marcha los mecanismos de la adicción al alcohol.

7.2. Dependencia al alcohol.

La *dependencia* es el resultado de los fenómenos de neuroadaptación que han tenido lugar en el cerebro durante el proceso de consumo crónico de alcohol.

Se manifiesta por la presencia de conductas que demuestran la necesidad y pérdida de libertad frente al alcohol, con dificultad para controlar su consumo, así como por la existencia de tolerancia y síndrome de abstinencia tras parar bruscamente o disminuir de forma importante la ingesta de etanol. La dificultad para controlar el consumo de etanol incluye tanto la dificultad de controlar el ansia de beber (craving) como la incapacidad de parar de beber una vez se ha empezado. Esto es a lo que denominamos *alcoholismo*. En la tabla se resumen las principales características de la dependencia del alcohol (tabla 1).

Tabla 1. Principales características clínicas de la dependencia del alcohol.

Deseo insaciable	Gran necesidad o deseo compulsivo de beber alcohol
Pérdida de control	Incapacidad para dejar de beber alcohol una vez que se haya comenzado
Dependencia física	Síndrome de abstinencia con síntomas tales como: náuseas, sudor, temblores y ansiedad, que aparecen cuando se deja de beber alcohol.
Tolerancia	Necesidad de beber cada vez más cantidad de alcohol a fin de sentirse eufórico.

Fuente: Modificado del www.niaaa.nih.gov/FAQs/General-Spanish/FAQEsp1.htm

El síndrome de abstinencia del alcohol se caracteriza por presentar molestias como náuseas, temblores y ansiedad, que ceden cuando se bebe etanol. Cuando el síndrome de abstinencia es más grave, pueden aparecer otros síntomas como aumento de la sudoración y de la frecuencia cardíaca, inquietud y finalmente *Delirium Tremens*. Éste es el máximo exponente del síndrome de abstinencia y es un estado agudo fluctuante, caracterizado por la disminución del nivel de conciencia o confusión (*delirium*), la aparición de alucinaciones y temblor. Suele acompañarse de agitación, insomnio e hiperactividad vegetativa, que pueden llevar a la muerte si no se trata adecuadamente.

7.3. Mecanismos de la adicción.

Para entender los factores que llevan a los individuos al consumo excesivo de etanol, la investigación se ha centrado en la identificación de los mecanismos cerebrales que sustentan los efectos reforzantes del etanol y los cambios neuroadaptativos progresivos que se producen por su consumo y que conducen al desarrollo de la dependencia.

Se ha implicado a varios sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico, el cannabinoide y el opioide, en los efectos reforzantes asociados al consumo de etanol, si bien el sistema dopaminérgico es el más estudiado y el que juega un papel fundamental.

7.3.1. Interacción etanol – sistema dopaminérgico.

Aunque las drogas adictivas presentan una gran diversidad molecular y actúan sobre diversos receptores y estructuras, existe un factor común a las mismas, que es la activación de la vía mesocorticolímbica dopaminérgica, crítica en el proceso de adicción (Shippenberg y Elmer, 1998; Melichar y col., 2001). Esta vía comprende un grupo de cuerpos celulares que se originan en el ATV y que proyectan a varias regiones cerebrales, incluyendo el cerebro anterior, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza frontal, amígdala, así como al hipocampo (Fallon y Moore, 1978; Swanson, 1982). Se ha propuesto que este sistema modula la actividad del núcleo accumbens, una región que parece ser la vía final común en la regulación de las acciones reforzantes positivas de las drogas de abuso que consumen los humanos (Robbins y Everitt, 1996).

El etanol es un reforzador positivo, por lo que ha prevalecido la investigación de la activación de la función dopaminérgica en el ATV del circuito cerebral de recompensa (sistema mesolímbico dopaminérgico). Se ha demostrado que el etanol aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del ATV (Gessa y col., 1985; Brodie y col., 1990; 2000) a través de una activación celular excitatoria directa (Brodie y col., 1999). Además, empleando metodologías como la microdiálisis y la voltametría, se ha comprobado que la administración de la mayoría de las drogas de abuso, incluido el etanol (Wozniak y col., 1991; Yoshimoto y col., 1992; Tuomainen y col., 2003), aumenta la liberación de DA en el núcleo accumbens (Imperato y Di Chiara, 1986), aunque varios estudios han evidenciado que son acciones directas sobre los cuerpos neuronales de las neuronas

dopaminérgicas en el ATV, más que sobre las terminaciones dopaminérgicas en el núcleo accumbens (Yim y Gonzales, 2000; Budygin y col., 2001).

Por otro lado, existen evidencias que confirman el papel fundamental de la DA en los efectos reforzantes del etanol, como son el mantenimiento de la autoadministración de etanol tras la microinyección de etanol en el ATV (Gatto y col., 1994), el aumento dosis dependiente de la liberación de DA en el núcleo accumbens en animales que se autoadministran etanol (Weiss y col., 1993; 1996) o la reducción de los efectos reforzantes de la droga mediante la utilización de fármacos que interfieren en la transmisión dopaminérgica en el ATV o el núcleo accumbens (Samson y Harris, 1992; Hodge y col., 1997; Myers y Robinson, 1999). Además, la manipulación de la expresión génica de los receptores dopaminérgicos (D_1 y D_2) y la utilización de animales carentes de esos mismos receptores, apoyan el papel de la dopamina en los efectos reforzantes del etanol (Risinger y col., 2000; 2001).

A pesar de que el consumo agudo de etanol activa la neurotransmisión dopaminérgica, la abstinencia tras el consumo crónico conduce a una disminución en la actividad dopaminérgica en el ATV (Diana y col., 1992; Shen y Chiodo, 1993) y en los niveles extracelulares de DA en el núcleo accumbens (Rossetti y col., 1992; Weiss y col., 1996). Esta circunstancia indica que la ingesta crónica de etanol induce hipofunción dopaminérgica, lo que lleva al mantenimiento del consumo de etanol y, por tanto, contribuye al desarrollo de la dependencia, por la aparición de un proceso compensatorio debido a la disminución de la efectividad en la liberación de dopamina.

8. Efectos del etanol en animales de experimentación.

Está ampliamente descrito que el consumo crónico de etanol da lugar a procesos neurodegenerativos en regiones específicas del cerebro (Freund, 1973; Walker y Freund, 1971; 1973), afectando a la neurotransmisión de diferentes sistemas, como se describe a continuación. Es importante destacar que, en algunos casos, los efectos del etanol varían dependiendo de si el consumo es agudo o crónico.

8.1. Efecto sobre el sistema glutamatérgico.

Es ampliamente conocido que la administración de etanol, tanto aguda como crónica, altera la neurotransmisión glutamatérgica. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y ejerce su acción a través de varios receptores, entre ellos el receptor NMDA, asociado a un canal de calcio. Así, la activación de dicho receptor por la unión del glutamato promueve la entrada de Ca^{2+} al interior celular.

Ahora bien, estudios experimentales *in vitro*, en cultivos neuronales, han demostrado que la administración aguda de etanol inhibe, de manera dosis-dependiente, la corriente iónica activada por

el receptor NMDA así como la entrada de Ca^{2+} y la acumulación de GMPc estimuladas por NMDA en varias regiones cerebrales (Hoffman y col., 1989; Lovinger y col., 1989; Gonzales y Hoffman, 1991).

Existe cierta controversia acerca de los mecanismos implicados en esta inhibición. El receptor NMDA contiene distintos sitios de unión para el glutamato, la glicina y otros compuestos que modulan la actividad del glutamato. De estos sitios, el etanol parece actuar sobre el sitio de la glicina, de manera que la inhibición ejercida por la administración aguda de etanol origina una disminución del flujo de Ca^{2+} a través del canal, que puede ser antagonizada por dosis elevadas de glicina (Blum y col., 1974; Rabe y Tabakoff, 1990). Sin embargo, años más tarde, Cebers y col. (1996) sugirieron que el etanol y la glicina actúan en diferentes sitios del receptor NMDA, al observar que, en ninguno de los ensayos usados para demostrar los efectos inhibitorios del etanol sobre la actividad del receptor NMDA, la inhibición inducida por etanol es revertida por glicina. En este sentido, se ha propuesto que el etanol inhibe la actividad del receptor NMDA mediante su interacción con una región hidrofóbica del canal (Weight y col., 1991).

Además de inhibir los receptores NMDA, estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* muestran que la administración aguda de etanol también disminuye de manera significativa los niveles extracelulares de glutamato (Moghaddam y Bolinao, 1994; Piepponen y col., 2002; Zuo y col., 2007), si bien se ha observado que a bajas dosis, 0,5-1 mg/kg, el etanol aumenta dichos niveles (Moghaddam y Bolinao, 1994; Selim y Bradberry, 1996), lo que sugiere una relación entre los efectos bifásicos del etanol sobre el comportamiento y sus efectos sobre el sistema glutamatérgico.

En contraste, la administración crónica de etanol ocasiona una disfunción de la transmisión glutamatérgica y de la función del receptor NMDA, que resulta en un aumento de la densidad del receptor NMDA (Grant y col., 1990; Gulya y col., 1991; Iorio y col., 1992) y de la expresión, tanto del ARNm como de la proteína, de las subunidades del receptor en el SNC (Follesa y Ticku, 1995; 1996; Kalluri y col., 1998; Chandler y col., 1999; Bao y col., 2001). Como resultado de este aumento en la densidad del receptor NMDA, las respuestas mediadas por NMDA contribuyen a la hiperexcitabilidad y excitotoxicidad asociadas al síndrome de abstinencia tras el consumo crónico de etanol (ver apartado 6.1.). En este sentido, se ha observado un aumento en el contenido extracelular de aminoácidos excitatorios en el hipocampo de ratas durante el síndrome de abstinencia (Sepúlveda y col., 1995; Dahchour y De Witte, 2003a,b). Se ha sugerido que este incremento en los niveles extracelulares de glutamato puede ser debido en parte a una disminución del transportador de glutamato (Meléndez y col., 2005).

Los receptores NMDA están compuestos por conjuntos de subunidades tetraméricas y heteroméricas, que poseen diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas y se distribuyen de modo distinto por todo el SNC. Hasta la fecha, se han clonado dos familias de subunidades, NR1 y NR2; de esta última se conocen la NR2A, B, C y D. Estudios recientes muestran que el tratamiento

crónico con etanol incrementa la expresión del ARNm de la subunidad NR2B, sin alterar apenas la expresión de NR1 (Sheela Rani y Ticku, 2006). No obstante, existe controversia, ya que Roberto y col. (2006) observaron un aumento en los niveles del ARNm de la subunidad NR1 tras la administración crónica de etanol.

Finalmente, señalar que se ha observado que las neuroadaptaciones en la función sináptica, en la expresión génica y la composición protéica de los receptores NMDA inducidas por la administración crónica de etanol son reversibles (Roberto y col., 2006).

8.2. Efecto sobre el sistema gabérgico.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Es uno de los principales sistemas implicados en los efectos agudos del etanol, junto con el glutamatérgico. En este sentido, parece que los efectos iniciales estimulantes del etanol pueden deberse a la inhibición de la actividad gabérgica, mientras que los efectos sedantes subsiguientes al consumo de dosis altas pueden estar mediados por la activación de este sistema inhibitorio (Reynolds y col., 1992).

Estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* en ratas han puesto de manifiesto que la administración aguda de etanol no afecta a la liberación de GABA en el núcleo accumbens. Así, Heidbreder y De Witte (1993) no observaron cambios en los niveles extracelulares de GABA en el núcleo accumbens tras la administración i.p. de una dosis de etanol de 1 g/kg. Dosis mayores de etanol (2-3 g/kg) tampoco modificaron dichos niveles extracelulares de GABA (Dahchour y col., 1994; Zuo y col., 2007). De la misma manera, Cowen y col. (1998) tampoco observaron cambios en los niveles extracelulares de GABA tras la administración nasogástrica de 5 mL de etanol 20 %. Sin embargo, existe cierta controversia acerca del efecto de la administración aguda de etanol sobre la liberación de GABA, ya que también se ha descrito una disminución de dicha liberación tras la administración de una dosis de etanol de 3 g/kg (Piepponen y col., 2002).

El etanol incrementa la eficacia de GABA actuando a través de los receptores de GABA, en especial a través del receptor GABA_A. Así, numerosos estudios han demostrado que la administración aguda de etanol aumenta tanto las respuestas electrofisiológicas del GABA *in vivo* e *in vitro* como la activación del receptor GABA_A (Reynolds y col., 1992; Proctor y col., 1992; Freund y col., 1993; Criswell y col., 1993). En dicho receptor, el etanol favorece la apertura del canal de cloro inducida por GABA, que se traduce en hiperpolarización neuronal, una disminución de la excitabilidad neuronal y, consecuentemente, de su actividad funcional (Soldo y col., 1994). Sin embargo, no todos los receptores GABA son sensibles al etanol, debido a la heterogeneidad de las subunidades que componen dicho receptor (Criswell y col., 1993; Harris y col., 1995b). En este sentido, Wafford y col. (1991) postularon que la sensibilidad del receptor GABA_A al etanol depende específicamente de la presencia de la subunidad $\gamma 2$ en dicho receptor.

Weiner y col. (1994) examinaron los mecanismos moleculares responsables de esta potenciación de la corriente inhibitoria de GABA_A inducida por etanol en neuronas hipocámpales y observaron que se requiere la presencia de ATP intracelular. También mostraron que inhibidores específicos de la PKC antagonizan dicha transmisión sináptica del GABA_A, lo que sugiere que la sensibilidad al etanol de este receptor requiere también una fosforilación mediada por PKC. Estos resultados han sido confirmados *in vivo* al demostrar que ratones mutantes carentes de la isoforma γ de la PKC muestran una menor sensibilidad a la hipotermia inducida por etanol y a la duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento, efectos mediados por la neurotransmisión gabérgica (Harris y col., 1995a). Además, el etanol no potenció el flujo del ión cloro mediado por GABA en vesículas cerebrales preparadas a partir de estos ratones knockout para PKC γ .

En contraste, la administración crónica de etanol ocasiona una disfunción de la transmisión gabérgica y de la función del receptor GABA_A, dando lugar a cambios adaptativos que resultan en una disminución de la densidad de dicho receptor.

En concreto, el tratamiento crónico de etanol resulta en una alteración en la regulación de la expresión de los ARNm que codifican las subunidades del receptor GABA_A. Así, Mhatre y Ticku (1992; 1993) y Morrow y col. (1994) observaron una disminución en los niveles del ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 5$ del receptor GABA_A en la corteza cerebral, que permanecieron disminuidas incluso hasta 24 h después de la abstinencia.

8.3. Efecto sobre el sistema dopaminérgico.

Como ya se ha comentado anteriormente (ver apartado 3.3.), estudios, tanto *in vivo* (mediante técnicas de microdiálisis) como *in vitro* (mediante técnicas de electrofisiología), demuestran que el etanol altera la neurotransmisión dopaminérgica. Así, la administración aguda de dosis bajas o moderadas de etanol aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del ATV (Gessa y col., 1985; Brodie y col., 1990; Yoshimoto y col., 1992; Brodie y Appel, 2000; Weiss y Porrino, 2002), a través de una excitación celular directa de dichas neuronas (Gessa y col., 1985; Brodie y col., 1999; Brodie y Appel, 2000). Contrariamente, dosis altas de etanol suprimen la actividad dopaminérgica, disminuyendo la liberación de DA en el núcleo accumbens (Mereu y Gessa, 1984; Imperato y Di Chiara, 1986; Blanchard y col., 1993; Budygin y col., 2001a,b), lo que sugiere que el etanol presenta una respuesta dopaminérgica bifásica.

Por otro lado, la administración aguda de etanol también modifica el contenido de los metabolitos de DA, si bien existen datos contradictorios en este sentido. Así, la administración de una dosis de etanol de 3,2 g/kg produce un incremento en los niveles de DOPAC en el núcleo caudado, pero no en la sustancia nigra ni en la corteza frontal (Fadda y col., 1980). De la misma manera, Saeed y Wooles (1984) observaron un marcado aumento en la concentración estriatal de DOPAC y HVA desde 30 hasta 120 min después de la administración de una dosis de etanol tanto de 1,75 g/kg

como de 3,5 g/kg. Por el contrario, Gil-Martín y col. (1996) observaron que la administración de una dosis de etanol de 1,5 g/kg produce un incremento en los niveles estriales de HVA, sin afectar a la concentración de DOPAC.

Se ha implicado a los receptores 5-HT₃ en el mecanismo por el cual el etanol provoca un aumento en la liberación de DA. De esta manera, Campbell y McBride (1995) observaron que la co-administración de una dosis de etanol de 2 g/kg (i.p.) junto con un agonista 5-HT₃, el 1-(m-clorofenil)-biguanida (CPBG) (administrado localmente a través de una sonda de microdialisis), aumenta todavía más los niveles extracelulares de DA en comparación con los que se observan tras la inyección de etanol únicamente. Además, este efecto es completamente prevenido por el antagonista 5-HT₃, ICS 205-930. Estos resultados fueron confirmados también por Yoshimoto y col. (1996) y más recientemente por Liu y col. (2006).

No obstante, el mecanismo por el cual el etanol incrementa la actividad dopaminérgica no está todavía bien establecido. Parece ser que el transportador de DA (DAT) no está implicado en dicho mecanismo, ya que estudios de microdialisis intracerebral *in vivo* y mediante voltametría han demostrado que el etanol tiene efectos similares en ratones carentes de DAT (knockout) y en ratones salvajes (Mathews y col., 2006). Así, cambios en el sistema de recaptación de DA tampoco están implicados en el incremento de los niveles extracelulares de DA que induce el etanol (Jones y col., 2006).

Muy recientemente, se ha implicado al sistema opioide en dicho mecanismo. Se conoce que la estimulación de los receptores opioides, localizados en el ATV, aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas; de esta manera, se ha propuesto que el etanol podría aumentar la transmisión dopaminérgica mediante una estimulación del sistema opioide endógeno. Así, la excitación dopaminérgica inducida por etanol es significativamente atenuada por el agonista del receptor opioide μ , el Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol encefalina (DAMGO), que inhibe las neuronas GABAérgicas (Xiao y col., 2007). De esta manera, el etanol excita las neuronas dopaminérgicas, al menos en parte, aumentando la supresión de la inhibición GABAérgica mediada por opioides. Además, la administración de naltrexona, un antagonista opioide, previene la liberación de DA en el núcleo accumbens inducida tras la administración de etanol (Benjamín y col., 1993; Lee y col., 2005).

Por otro lado, la administración crónica de etanol también activa la neurotransmisión dopaminérgica, aumentando los niveles de DA en el núcleo accumbens (Badanich y col., 2007), si bien también se han descrito niveles de DA más bajos en el estriado e hipocampo tras el tratamiento crónico de etanol (Vasconcelos y col., 2004). La alteración de los niveles de DA tras el consumo crónico de etanol, depende de la dosis y del tiempo transcurrido después de la última administración de la droga. No obstante, la abstinencia de etanol ocasiona una disminución en la liberación de DA y

en la función dopaminérgica en el núcleo accumbens, disminución que es revertida por la auto-administración de etanol.

Además, el tratamiento crónico de etanol produce un aumento en la densidad del transportador de DA, en comparación con los animales control, tratados con agua, que es consecuencia de un incremento en la V_{\max} del transportador. Sin embargo, no se sabe si los cambios en la V_{\max} del transportador inducidos por etanol son debidos a diferencias en el número de transportadores disponibles o a diferencias en la velocidad de operación de un número similar de transportadores (Carroll y col., 2006).

8.4. Efecto sobre el sistema serotoninérgico.

Existe cierta controversia acerca de si la administración de etanol, tanto aguda como crónica, en animales de experimentación produce cambios en los niveles cerebrales de 5-HT y de su principal metabolito, el 5-HIAA.

En cuanto a la administración aguda de etanol, Fukumori y col. (1980) observaron que la administración de una dosis baja de etanol (1 g/kg) no altera los niveles cerebrales de 5-HT, aunque una dosis mayor (2 x 1,5 g/kg) produce un incremento en el contenido de 5-HIAA. Estos resultados fueron confirmados por Murphy y col. (1988), quienes observaron que la administración de una dosis de etanol de 2,5 g/kg provoca un aumento del 20 % en los niveles de 5-HIAA en la corteza frontal, estriado e hipotálamo. Lafuente y col. (1992) administraron una dosis más elevada de etanol (4 g/kg) y observaron un incremento en los niveles de 5-HT y 5-HIAA, que no es debido a un aumento en la síntesis de 5-HT, sino a una disminución de la velocidad de eliminación de 5-HIAA. Sin embargo, Khatib y col. (1988) indicaron que la administración de una dosis de etanol de 2,5 g/kg no altera los niveles de 5-HT ni de 5-HIAA en ninguna de las regiones examinadas. Es más, Gil-Martín y col. (1996) describieron una disminución en los niveles de 5-HT y 5-HIAA en la corteza frontal tras la administración de etanol (1,5 g/kg, i.p.).

Por otro lado, estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* han puesto de manifiesto que la administración aguda de etanol estimula la liberación de 5-HT en el núcleo accumbens. Así, Yoshimoto y col. (1992) observaron que la administración i.p. de etanol a una dosis de 1 y 2 g/kg incrementa significativamente los niveles extracelulares de 5-HT en el núcleo accumbens. De la misma manera, la perfusión local de etanol (100 mM) a través de la sonda de microdiálisis aumenta al doble los niveles de 5-HT y 5-HIAA. Además, la adición al líquido de perfusión de ICS 205-930, un antagonista de receptores 5-HT₃, reduce la liberación de 5-HT inducida por etanol, lo que sugiere que la acción del etanol en el núcleo accumbens está mediada por estos receptores 5-HT₃.

En cuanto al efecto de la administración crónica de etanol sobre el sistema serotoninérgico, también existe cierta controversia. Por un lado, Gothóni y Ahtee (1980) describieron una disminución en el contenido de 5-HT y un aumento en los niveles de 5-HIAA durante el tratamiento crónico de

etanol. Estos resultados han sido confirmados más recientemente por Uzbay y *col.* (1998; 2000), quienes observaron una disminución en los niveles de 5-HT en corteza y estriado y un aumento en los niveles de 5-HIAA en el hipocampo, en el décimo día del consumo de etanol. Estos niveles volvieron a valores basales el día 21 del consumo de etanol, lo que sugiere el desarrollo de tolerancia a los efectos del etanol.

Sin embargo, otros grupos, o no han observado cambios, o describen aumento, en los niveles de 5-HT en el cerebro de ratas tratadas crónicamente con etanol. Por ejemplo, Pohorecky y *col.* (1974) y Murphy y *col.* (1983) no observaron ninguna alteración en los niveles de 5-HT durante el consumo crónico de etanol en ninguna de las regiones estudiadas. Por otro lado, Badawy y *col.* (1980) y Mena y Herrera (1980) encontraron un incremento en los niveles de 5-HT y 5-HIAA. Un incremento en los niveles de 5-HT también ha sido descrito recientemente por el grupo de Vasconcelos y *col.* (2004). Se ha propuesto que estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en los protocolos experimentales tales como periodo de exposición, dosis utilizadas e intervalos de observación (Uzbay y *col.*, 2000; Vasconcelos y *col.*, 2004).

8.5. Efecto sobre el sistema opioide.

El etanol afecta también al sistema opioide endógeno (Volpicelli y *col.*, 1986), y lo hace de dos maneras (Ulm y *col.*, 1995). La primera alterando la síntesis o liberación de péptidos opioides (activando el mecanismo de refuerzo) y la segunda modificando la unión de los receptores opioides y alterando, de esta manera, la señalización opioide.

Numerosas evidencias sugieren que el etanol altera los niveles de los péptidos opioides endógenos en el cerebro de animales de experimentación. Así, la administración aguda de etanol produce un aumento en la liberación de β -endorfina en la hipófisis, hipotálamo y otras regiones cerebrales (Gianoulakis y Barcomb, 1987; Thiagarajan y *col.*, 1989). Sin embargo, los estudios de administración crónica de etanol sobre los niveles de expresión génica de β -endorfina no son consistentes debido a la utilización de distintos modelos animales, la metodología de la administración o la duración de los tratamientos. En este sentido, cabe destacar que algunos estudios han demostrado un aumento en la expresión génica de β -endorfina sérica y cerebral (Seizinger y *col.*, 1984a; Gianoulakis y *col.*, 1988; Wand, 1990), mientras que otros han encontrado una reducción de su expresión (Seizinger y *col.*, 1984b; Dave y *col.*, 1986).

También existe cierta controversia acerca de los efectos del etanol sobre los niveles de encefalinas y dinorfinas. La administración aguda de etanol disminuye la expresión de encefalinas en el núcleo accumbens y en la amígdala de ratas no preferentes a etanol, mientras que aumenta dicha expresión en ratas preferentes, sin existir diferencias basales entre ambos grupos de animales (Li y *col.*, 1998). De Gortari y *col.* (2000) observaron un aumento en los niveles de encefalinas en la corteza prefrontal de ratas Wistar. Muy recientemente, Chang y *col.* (2007) observaron que la

inyección aguda de una dosis de etanol de 1 g/kg incrementa la expresión de encefalinas y dinorfina en el núcleo paraventricular hipotalámico. En los estudios crónicos, existen trabajos que describen un aumento en el contenido del péptido en distintas regiones cerebrales (Lucchi y col., 1984), frente a otros que muestran una disminución o incluso ausencia de efecto (Schulz y col., 1980; Seizinger y col., 1983). Chang y col. (2007) también estudiaron el consumo crónico de etanol sobre los niveles de estos péptidos y observaron un aumento tanto del ARNm como del péptido en el hipotálamo.

Por otro lado, el consumo de etanol puede alterar, no sólo la actividad de los péptidos opioides endógenos, sino que también puede modificar la afinidad o la densidad de los receptores opioides en distintas estructuras cerebrales (Hiller y col., 1984; Charness, 1983; Tabakoff y Hoffman, 1983; Fadda y col., 1999).

8.6. Efecto sobre la formación de radicales libres y estrés oxidativo.

Existe una amplia bibliografía que demuestra que la administración de etanol produce un aumento del estrés oxidativo en el cerebro de animales de experimentación (Albano y col., 1988; Montoliu y col., 1995; Somani y col., 1996; Mansouri y col., 2001; Johnsen-Soriano y col., 2007).

La oxidación del etanol a acetaldehído da lugar a varias especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^\bullet), que resultan en alteraciones del ADN, lípidos y proteínas que comprometen la supervivencia celular (Sagara y col., 1998). Así, Ku y col. (2006) demostraron *in vitro* que el etanol aumenta, de manera dosis dependiente, la concentración de EROs en cultivos hipocampales. También se ha demostrado *in vivo* la generación de radicales libres tras la administración de etanol utilizando la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo* y el método atrapador del salicilato (Huang y col., 2002; Dahchour y col., 2005).

Además, se ha observado que la oxidación del etanol da lugar al radical hidroxietil, un radical de gran capacidad reactiva. Así, Gonthier y col. (1991) observaron, mediante espectrometría de resonancia del espín electrónico, un aumento en la formación de dicho radical tras la exposición a etanol en microsomas cerebrales.

Por otro lado, está ampliamente descrito que el etanol aumenta el grado de peroxidación lipídica cerebral, reflejada tanto como un aumento de malondialdehído (Rouach y col., 1987; Kumral y col., 2005; Smith y col., 2005) como un incremento en la acumulación de lipofuscina, productos finales de la destrucción oxidativa de los lípidos de membrana (Borges y col., 1986; De Freitas y col., 2004; Assuncao y col., 2007a; b).

Pero además, este proceso de estrés oxidativo cerebral inducido por etanol no sólo está mediado por un aumento en las especies reactivas de oxígeno y un aumento en el grado de peroxidación lipídica, sino también por una reducción en la actividad de las principales enzimas y

sistemas antioxidantes del SNC, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutathion peroxidasa (Nordmann, 1987; Uysal *y col.*, 1989; Bondy *y col.*, 1996; Ward *y col.*, 2001; Calabrese *y col.*, 2002; Aydin *y col.*, 2002; Pushpakiran *y col.*, 2004). Por otro lado, la capacidad antioxidante del SNC también depende de los antioxidantes exógenos proporcionados por los nutrientes, como la vitamina E, la cual también está disminuida tras la administración de etanol (Augustyniak *y col.*, 2005).

8.7. Efecto sobre la temperatura rectal.

Es ampliamente conocido el efecto hipotérmico del etanol. Existe una gran cantidad de evidencia que demuestra que la administración aguda de etanol disminuye, de manera dosis-dependiente, la temperatura rectal tanto de ratas (Lomax *y col.*, 1980; Myers, 1981; Alari *y col.*, 1987; Popova *y Ivanova*, 2002;) como de ratones (Crabbe *y col.*, 1979; Papanicolau *y Fennessy*, 1980; Brick *y Horowitz*, 1982; Maickel *y Nash*, 1985; Crawshaw *y col.*, 2001).

No obstante, Gallaher *y col.* (1987) observaron a los animales durante 4 días tras la administración aguda de etanol y comprobaron la aparición de una ligera hipertermia tras la recuperación de la hipotermia inducida por etanol, que permanece durante varios días. Esta hipertermia puede ser considerada dentro del contexto de las teorías homeostáticas de la tolerancia y la dependencia física, de tal manera que la hipotermia inducida por etanol iniciaría mecanismos de conservación o producción de calor, para revertir el efecto agudo de la droga. Así, la desaparición de la droga y de su efecto hipotérmico daría lugar a una alteración del balance de control de la temperatura, produciendo un estado hipertérmico temporal. Otra alternativa posible que explica la aparición de hipertermia tras la hipotermia inducida por etanol es la alteración de los ritmos circadianos normales. El etanol altera los ritmos de sueño normales (Wagman *y col.*, 1975; Allen *y col.*, 1977) y se ha demostrado que estos ritmos influyen sobre la termorregulación (Walker *y col.*, 1983).

Se han estudiado los mecanismos implicados en la hipotermia inducida por etanol, si bien, todavía no se conocen con exactitud. Por un lado, Pohorecky *y col.* (1976) y, más recientemente, Popova *y Ivanova* (2002) han implicado al sistema serotoninérgico en la hipotermia del etanol, al observar que la administración del antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, el poli-metileno-poli-fenil isocianato (p-MPPI), reduce de manera dosis-dependiente la hipotermia inducida por etanol, lo que sugiere la implicación de este receptor en el mecanismo de la hipotermia. Sin embargo, un estudio más reciente llevado a cabo por el grupo de Boyce-Rustay *y col.* (2006) ha descartado la implicación del transportador de 5-HT en la hipotermia inducida por etanol, al observar que ratones carentes de dicho transportador presentan la misma hipotermia tras etanol que animales salvajes.

Por otro lado, dosis repetidas de etanol, a intervalos de 24-72 h, conducen al desarrollo de tolerancia a los efectos hipotérmicos del etanol (Maickel *y Nash*, 1985; Feller *y col.*, 1993; Rustay *y*

col., 2001; Palmer y col., 2002). Esta tolerancia no se relaciona con cambios en el metabolismo del etanol, ya que se ha observado que las concentraciones de etanol en plasma no difieren en ratones tolerantes y no tolerantes (Crabbe y col., 1979).

Finalmente, la administración previa de una o varias dosis de etanol altera la capacidad de termorregulación de las ratas y ratones, que se manifiesta cuando son expuestos a una temperatura ambiental baja y elevada (Myers, 1981; Kalant y Le, 1983; Gordon y Moler, 1990). Así, la administración de etanol antes de situar a los animales a una temperatura ambiental elevada (30 °C), provoca en ellos una elevación de la temperatura rectal más acusada que la observada en animales no inyectados previamente con la droga; de la misma manera, la administración de etanol antes de situar a los animales a una temperatura ambiente baja (4 °C), provoca en ellos una hipotermia más acusada (Myers, 1981).

Brattstrom (1970) utilizó por primera vez el término *poiquilothermia* para definir un estado fisiológico en el cual la temperatura de un animal se aproxima a la temperatura ambiente en la que es mantenido. Aunque algunas drogas o compuestos químicos pueden alterar la temperatura corporal de los animales en una dirección u otra (hiper/hipotermia), ciertos compuestos ejercen una acción claramente poiquilotérmica. Myers (1981) realizó una serie de experimentos con el propósito de elucidar los efectos neurofarmacológicos del etanol sobre la temperatura corporal de la rata y confirmó que el etanol afecta al sistema termorregulador ejerciendo acciones poiquilotérmicas.

9. Efectos del etanol en humanos.

Existe una gran heterogeneidad de efectos debido a la dificultad que implica el establecimiento de medidas fiables de los niveles y patrones de consumo de alcohol, que hacen complicado comparar directamente estos estudios. Además, los efectos sobre cada individuo dependen de diversos factores como la cantidad total ingerida, la rapidez del consumo, el peso corporal, la presencia de comida en el estómago, el género, la edad, el estado de ánimo, la tolerancia adquirida, así como el consumo de medicamentos o de otras drogas.

El etanol es tóxico para la mayoría de los sistemas y tejidos del organismo, si bien el SNC es el sistema más afectado. El etanol es principalmente un depresor de la transmisión nerviosa en el SNC, aunque también posee efectos estimulantes que dependen de su concentración en sangre. Estos efectos estimulantes, que aparecen con el consumo de dosis bajas de etanol, responden a una acción farmacológica de desinhibición cortical (Pohorecky y Brick, 1988). Conforme aumentan los niveles de etanol en sangre, se incrementa la depresión central, debido a que el efecto inhibitor va a ir afectando a otros centros nerviosos.

Se observan dos tipos de efecto o intoxicación debido al consumo de alcohol, cada uno con características distintas: la *intoxicación aguda*, ocasionada por la ingesta masiva de etanol, y la *intoxicación crónica*, provocada por intoxicaciones agudas repetidas o excesivo y continuado consumo de etanol.

9.1. Intoxicación aguda.

9.1.1. Efectos psicológicos y fisiológicos.

Dentro de una gran variabilidad individual, los efectos del etanol son proporcionales a su concentración en sangre. El efecto inicial del etanol se observa a partir de concentraciones tan bajas como 20 a 30 mg/dL y se manifiesta en forma de aparente estimulación, como consecuencia de la depresión de los mecanismos inhibidores de control nervioso. Así, tiene lugar un cuadro de pseudoexcitación, con sensación de euforia y optimismo y aumento de la sociabilidad; la conducta aparece más espontánea y menos autocontrolada, pero disminuye la habilidad psicomotora más fina, aumenta el tiempo de reacción y se pierde la capacidad de concentración e intuición. Conforme aumenta la alcoholemia (a partir de 100-150 mg/dL), se generaliza la depresión central y se vuelve más manifiesta, tanto a nivel psicológico como psicomotor, apareciendo torpeza expresiva y motora (disartria y ataxia), con pérdida de reflejos, sopor y sueño. Concentraciones más elevadas (entre 400 y 500 mg/dL) producen pérdida de conciencia, coma e incluso la muerte (Pohorecky y Brick, 1988). En la tabla 2 se expone la relación entre la concentración plasmática de alcohol y las manifestaciones clínicas.

Nivel de alcoholemia g/l	Clínica
<0,5 g/l	Logorrea, inyección conjuntival, locuacidad. Afectación del control motor fino; euforia en etapas iniciales, deterioro leve de las funciones cognitivas y de la facultad crítica y pérdida de habilidades motoras.
0,5-1 g/l	Deterioro moderado de las funciones cognitivas, dificultad para grandes habilidades motoras, riesgo de accidentes de tráfico.
1-3 g/l	Ataxia, disartria, diplopia, nistagmus, deterioro mental y físico, agresividad, excesiva euforia. Taquicardia, taquipnea, trastornos vasomotores. Náuseas, vómitos
3-5 g/l	Coma sin signos de focalidad, hipotermia, hipotonía, midriasis bilateral hiporeactiva, abolición de reflejos osteotendinosos, bradicardia, hipotensión y depresión respiratoria.
>5 g/l	Muerte.

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la intoxicación alcohólica aguda.

Por otro lado, la administración aguda y crónica de etanol produce diversos efectos sobre el sueño. En personas no alcohólicas, el consumo agudo de etanol reduce la latencia inicial para el sueño y el sueño REM al principio de la noche, mientras que en los alcohólicos crónicos se produce

una fragmentación notable del sueño, con frecuentes despertares (Roehrs y col., 2003; Cohn y col., 2003; Roehrs y Roth, 2001).

Otros efectos son una vasodilatación cutánea, que produce pérdida de calor, un aumento de la secreción salivar y gástrica y un incremento de la diuresis, ya que inhibe la hormona antidiurética. No obstante, si se administra en dosis repetidas puede tener un efecto antidiurético (Rodrigo y col., 1998). Por otro lado, inhibe la libido en el hombre y la potencia sexual.

9.2. Efectos crónicos.

9.2.1. Efectos psicológicos y fisiológicos.

Tras el consumo crónico de etanol, muchos de los mecanismos bioquímicos implicados en sus acciones agudas se ven alterados y el organismo establece una serie de fenómenos de adaptación, como la tolerancia y la dependencia. La proporcionalidad entre concentraciones plasmáticas y efectos se ve alterada por el desarrollo de la tolerancia, de manera que los efectos motores, sedantes, ansiolíticos o anestésicos del etanol disminuyen de intensidad tras el consumo crónico de etanol.

En cuanto a los efectos neuropsicológicos, el consumo crónico de etanol produce trastornos sobre el estado de ánimo y la ansiedad, así como también deprime el SNC, produciendo depresión clínica, confusión y, en los casos más graves, psicosis y trastornos mentales. Además, diversos estudios realizados en sujetos alcohólicos en período de abstinencia han encontrado déficits en: inteligencia, memoria, aprendizaje verbal y no verbal, resolución de problemas, percepción y velocidad de procesamiento de información.

Por otro lado, son muy amplios los efectos fisiológicos asociados al consumo crónico de etanol, afectando a la mayor parte de los sistemas funcionales del organismo. De esta manera, provoca graves trastornos cerebrales, alteraciones del aparato digestivo (hepatitis, cirrosis, gastritis, pancreatitis) y del aparato cardiovascular (cardiopatía, hipertensión arterial). También aumenta los niveles de los triglicéridos, contribuyendo al riesgo de infarto. El alcoholismo severo se asocia con la osteoporosis y la debilidad de los músculos con hinchazones y dolor. Suprime también el sistema inmunitario, haciendo a los alcohólicos propensos a las infecciones, en particular a la neumonía. Además, aumenta los niveles de estrógenos y disminuye los niveles de testosterona, factores que contribuyen a la impotencia en los hombres. Importantes son también los trastornos metabólicos producidos por el etanol, como la cetoacidosis y la hipoglucemia alcohólicas.

9.2.2. Efectos neurotóxicos.

El SNC es el sistema más afectado por el alcohol. Como ya se ha comentado, la ingesta crónica excesiva de etanol se relaciona con trastornos neurológicos y mentales graves. Además, las deficiencias nutricionales y vitamínicas (tiamina) debidas a la malnutrición, junto con las deficiencias

en la función gastrointestinal y hepática que presenta el individuo alcohólico, son las responsables de la aparición de los síndromes de Wernicke y Korsakoff y de las polineuropatías periféricas.

De esta manera, se ha observado en el cerebro de alcohólicos crónicos una variedad de cambios neuropatológicos y morfológicos. De esta manera, los estudios que han empleado técnicas morfométricas computarizadas y técnicas de neuroimagen, como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM), demuestran la existencia de alteraciones en el número, tamaño, estructura y conectividad sináptica neuronal en los encéfalos de alcohólicos crónicos (Bergman y *col.*, 1985; Muuronen y *col.*, 1989; Harper y Corbett, 1990; Charness, 1993). Además, estos estudios muestran que el cerebro de alcohólicos es reducido en peso y en volumen (Carlen y *col.*, 1981; Lindboe y Loberg, 1988; Harper y Kril, 1994), correlacionándose el grado de atrofia cerebral con la velocidad y la cantidad de alcohol consumido a lo largo de la vida (Harding y *col.*, 1996).

Se ha descrito que el etanol induce apoptosis en el cerebro de la rata (Ikonomidou y *col.*, 2000) y que aumenta el número de células positivas para la tinción de TUNEL en el cerebro de ratón (Pawlak y *col.*, 2002). De esta manera, Ikegami y *col.* (2003) usaron la tinción de TUNEL para detectar daño del ADN en el cerebro de alcohólicos humanos, observando un aumento en el número de células positiva para TUNEL, en contraste con los controles no alcohólicos. Ninguna de estas células positivas muestra alguna característica de apoptosis o necrosis, lo que sugiere que el daño del ADN inducido por etanol se relaciona con el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno.

Las técnicas de neuroimagen funcional han permitido obtener información sobre el metabolismo cerebral en alcohólicos crónicos. Los estudios que han utilizado PET para cuantificar el metabolismo cerebral de glucosa, coinciden en destacar el hipometabolismo frontal medial en alcohólicos (Adams y *col.*, 1993). No obstante, el contraste de los datos obtenidos mediante PET con los procedentes de la neuroimagen estructural permite descartar que este hipometabolismo se deba a una menor proporción de tejido en esa región (Samson y *col.*, 1986). Además, la espectroscopia con RM ha revelado reducciones en los niveles de N-acetil-aspartato, un marcador de la integridad neuronal (Schweinsburg y *col.*, 2001).

El consumo crónico de etanol también afecta a los sistemas de neurotransmisión. Así, en los alcohólicos se detecta una hipofuncionalidad del sistema serotoninérgico. Este déficit, por un mecanismo compensador, provocaría una necesidad de consumir más etanol para restablecer los niveles sinápticos de 5-HT. De hecho, se han observado niveles bajos del metabolito de 5-HT, el 5-HIAA, en el LCR de pacientes alcohólicos (Roy y *col.*, 1991; Heinz y *col.*, 2002). También se ha observado, mediante autorradiografía, una menor densidad del transportador de 5-HT en la zona anterior del cortex en personas alcohólicas frente a las no alcohólicas (Mantere y *col.*, 2002). De la

misma manera, se han descrito niveles plasmáticos de GABA más bajos en alcohólicos crónicos en comparación con sujetos no alcohólicos (Coffman y Petty, 1985), si bien la administración aguda de etanol provoca un aumento de los niveles plasmáticos de GABA en voluntarios sanos (Bannister y col., 1988). Por el contrario, existen niveles elevados de neurotransmisores excitatorios en el LCR de alcohólicos (Tsai y Coyle, 1998).

No obstante, existe una considerable evidencia de la reversibilidad de la atrofia cerebral en aquellos alcohólicos que mantienen la abstinencia. Las imágenes obtenidas mediante TAC y RM muestran cambios durante los primeros meses, aunque los estudios de seguimiento más largos, de cinco años, reflejan que la recuperación no llega a ser total (Muuronen y col., 1989; Charness, 1993). La reversibilidad de las alteraciones metabólicas recibe menos interés, pero existe una recuperación evidente del hipometabolismo frontal determinado mediante SPECT tras dos meses de abstinencia (Schweinsburg y col., 2001).

Finalmente, cabe citar los efectos teratógenos del etanol. Así, el consumo de etanol durante la gestación provoca en el feto el denominado *síndrome alcohólico fetal*, que se caracteriza por un crecimiento deficitario, anomalías craneofaciales y una disfunción del SNC. De esta manera, el consumo de etanol durante el embarazo está contraindicado, incluso a dosis moderadas, ya que no se ha definido la cantidad de etanol relacionada con este síndrome, ni el momento específico del embarazo (Spagnolo, 1993; Brien y Smith, 1991).

10. Mecanismos implicados en la neurotoxicidad inducida por etanol.

Aunque los efectos adversos inducidos por el etanol son bien conocidos, los mecanismos moleculares por los cuales produce toxicidad no están bien establecidos todavía. Además, en la actualidad persiste una importante controversia acerca de cuándo se inician estos efectos tóxicos, si durante la misma intoxicación o en los periodos de abstinencia (Fadda y Rossetti, 1998). Se han postulado diversos mecanismos.

10.1. Implicación del sistema glutamatérgico: receptor NMDA y Ca^{2+} intracelular.

Numerosos estudios señalan que la neurotoxicidad inducida por el etanol resulta de la hiperactividad del sistema glutamatérgico que se produce durante el síndrome de abstinencia. Como ya se ha comentado anteriormente (ver apartado 4.1.), el consumo crónico de etanol produce una inhibición continuada sobre el receptor NMDA, que se compensa mediante una regulación al alza de dicho receptor (Grant y col., 1990; Iorio y col., 1992; Snell y col., 1993; Trevisan y col., 1994; Hoffman y col., 1995). Estos cambios suponen un mecanismo homeostático que permite un nuevo equilibrio fisiológico para el funcionamiento celular (Tabakoff y Hoffman, 1996). Sin embargo, durante el síndrome de abstinencia, la desaparición del etanol produce un nuevo desequilibrio, en el que la elevada activación de los receptores NMDA y el aumento consiguiente en la concentración

intracelular de calcio, proporcionan un aumento en la excitabilidad neuronal tan elevado que produce daño o muerte celular (excitotoxicidad). Este proceso de excitotoxicidad pudiera ser, pues, el mecanismo implicado en el daño neuronal producido por el consumo de etanol.

Varias evidencias apoyan esta hipótesis. Por un lado, se ha demostrado un aumento en las concentraciones extracelulares de aminoácidos excitatorios en el hipocampo de ratas durante el síndrome de abstinencia (Sepúlveda y *col.*, 1995). También cabe citar el hecho de que, al menos, en preparaciones *in vitro* (Chandler y *col.*, 1993), el etanol puede evitar la aparición de algunos de estos índices de hiperexcitabilidad glutamatérgica.

Por otro lado, existen indicios de que el antagonista glutamatérgico MK-801 reduce los efectos teratógenos asociados al síndrome de abstinencia del etanol en ratas recién nacidas (Thomas y *col.*, 2002). Además, se ha visto que varias estructuras cerebrales activadas durante la abstinencia al alcohol presentan un aumento en la expresión del gen temprano c-fos (Morgan y *col.*, 1992), que es abolido por MK-801. Otros estudios con antagonistas de receptores NMDA también ponen de manifiesto un mecanismo de excitotoxicidad glutamatérgica durante el síndrome de abstinencia (Hoffman, 1995).

Estudios más recientes también apoyan este mecanismo de neurotoxicidad del etanol. Así, Harris y *col.*, (2003) observaron que acamprosato, SIB-1983 y MK-801, antagonistas de receptores NMDA, inhiben la neurotoxicidad y la entrada de calcio inducida por la abstinencia del etanol en cultivos hipocampales. Además, ese mismo año, Dahchour y De Witte (2003) demostraron, mediante la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo*, que el acamprosato protege frente a la neurotoxicidad inducida por etanol, disminuyendo la concentración de aminoácidos excitatorios, particularmente de glutamato, durante el síndrome de abstinencia del etanol.

Este mecanismo sitúa el inicio del daño en los periodos de abstinencia y propone que dicho daño no se debe a las acciones del etanol propiamente dicho, sino a las desregulaciones que se producen en su ausencia, tras la interrupción de su consumo continuado (Lovinger, 1993). Sin embargo, también se ha demostrado la existencia de procesos neurotóxicos tras el consumo crónico de etanol en animales que nunca han experimentado un síndrome de abstinencia (Nakamura y *col.*, 2000). Este hecho sugiere que existen otras acciones del etanol, distintas a los cambios producidos durante el síndrome de abstinencia, que pueden producir daño cerebral. De hecho, Obernier y *col.* (2002) cuantificaron el curso temporal de la neurotoxicidad inducida por etanol y observaron que ocurre durante la intoxicación con etanol y no como resultado del síndrome de abstinencia. Los mecanismos moleculares propuestos para explicar el daño cerebral desde esta posición señalan a su metabolismo y al estrés oxidativo inducido por el etanol como mediadores de sus efectos tóxicos en el SNC (Harper y *col.*, 1994; Pratt y *col.*, 1990).

10.2. Implicación del acetaldehído.

Varios estudios sugieren que algunos de los efectos farmacológicos atribuidos a la administración de etanol son mediados por su primer metabolito oxidativo, el acetaldehído (Hunt, 1996). No obstante, la implicación del acetaldehído en el daño cerebral inducido por etanol es motivo de gran controversia. Hasta fechas muy recientes, no se consideraba que el acetaldehído pudiera estar implicado en los efectos neurotóxicos del etanol, debido principalmente a dos motivos: en primer lugar, el acetaldehído accede con gran dificultad al SNC, debido a la presencia y efectividad de la enzima ALDH, que tanto en el hígado como en la barrera hematoencefálica (Sippel, 1974; Zimatkin, 1991), lo degrada antes de que acceda al SNC. Y por otra parte, se consideraba que la capacidad del tejido neuronal para metabolizar etanol era demasiado pequeña (Hunt, 1996; Zimatkin y Deitrich, 1995), y que, por tanto, el acetaldehído resultante de ese metabolismo difícilmente podría contribuir a los efectos del etanol en el cerebro.

Sin embargo, elevadas concentraciones de acetaldehído en sangre pueden saturar esa barrera enzimática formada por la ALDH entre la sangre y el cerebro, y así, penetrar en el cerebro (Quertemont y Tambour, 2004). Además, como ya se ha comentado (ver *apartado 2.1.*), diversos estudios han demostrado que el tejido neuronal es capaz de producir una oxidación del etanol tanto *in vivo* (Díaz y Gonzales, 2002) como *in vitro*, en homogenados de cerebro (Aragon *et al.*, 1992a; Gill y *col.*, 1992; Zimatkin y *col.*, 1998) así como en cultivos neuronales (Reddy y *col.* 1995; Eysseric y *col.*, 1997; 2000; Hamby-Mason y *col.*, 1997) por acción de la catalasa. De esta manera, la existencia del metabolismo cerebral del etanol sustenta la posibilidad de que el acetaldehído pueda ser responsable de algunos efectos neurotóxicos asociados al consumo de etanol.

El acetaldehído es una molécula de alta reactividad, capaz de unirse de manera covalente a una gran variedad de proteínas y biomoléculas para formar nuevas entidades bioquímicas, denominadas aductos (McKinnon y *col.*, 1987; Lin y *col.*, 1988; Jennett y *col.*, 1989; Nicholls y *col.*, 1992). Esto resulta en una alteración estructural y, consecuentemente, funcional de dichos sustratos, interfiriendo con el funcionamiento normal de la célula y comprometiendo incluso la viabilidad celular.

Así, la demostrada capacidad del acetaldehído para producir aductos con la tubulina impide su polimerización, interfiriendo en la formación de microtúbulos y alterando, no sólo la conformación del citoesqueleto, sino que impide el movimiento y transporte de orgánulos y proteínas (Smith y *col.*, 1989). Otros aductos, como los que forma con la albúmina, parecen poseer la actividad de estimular mensajeros intracelulares como la PKC (Wyatt y *col.*, 2001), lo que puede traducirse en un gran número de consecuencias a corto y a largo plazo. También se ha demostrado la capacidad del acetaldehído para formar aductos con el ADN, lo que resulta en importantes alteraciones de la expresión génica y en sus mecanismos de autorreparación (Pratt y *col.*, 1990; Brooks, 1997). Por otro lado, el acetaldehído es capaz de formar aductos con diferentes enzimas y suprimir su actividad

(Pratt y col., 1990), como por ejemplo, la bomba sodio-potasio, la aspartato aminotransferasa y la superóxido dismutasa, así como con algunos péptidos neurotransmisores, como las encefalinas, que con esta unión pierden su función opioide (Pratt y col., 1990).

En este sentido, existe una gran cantidad de evidencia que pone de manifiesto, mediante técnicas inmunohistoquímicas, la formación de aductos derivados del acetaldehído en el cerebro de roedores tras el consumo de etanol (Nakamura y col., 2000; Rintala y col., 2000; Upadhyaya y col., 2002). Estos hallazgos confirman los obtenidos en un estudio de un caso en el que también se demostró la presencia de estos aductos en el encéfalo de un alcohólico (Steinberg y col., 1997). Estos estudios han permitido demostrar, no sólo la presencia de estos aductos en el cerebro, sino también que su formación no es anatómicamente aleatoria, coincidiendo con aquellas áreas cerebrales para las que se describen daños estructurales o funcionales asociados al consumo crónico de etanol.

Dado que se ha visto que tales aductos causan toxicidad en diversos órganos, como el hígado, se ha sugerido una relación entre los aductos del acetaldehído en el cerebro y el daño neuronal.

10.3. Implicación del estrés oxidativo.

Debido a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y a la baja cantidad de enzimas antioxidantes en el cerebro, este órgano es particularmente susceptible al estrés oxidativo (Halliwell, 2007). Como ya se ha comentado, el etanol aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno e induce peroxidación lipídica. De esta manera, existe un elevado número de estudios que implican a estos radicales libres y al estrés oxidativo en la neurotoxicidad inducida por etanol, como se describe a continuación.

En primer lugar, el aumento de la capacidad antioxidante, mediante una dieta suplementada con distintos antioxidantes, como el ebselen (Johnsen-Soriano y col., 2007), el hidroxitolueno butilado (Crews y col., 2006) o una mezcla de vitamina C, cisteína y metionina (Amanvermez y col., 2006), disminuye la formación de radicales libres y atenúa el daño neuronal inducido por etanol.

Otros antioxidantes, como los polifenoles presentes en el vino, también son capaces de proteger de la neurotoxicidad inducida por etanol (de Freitas y col., 2004; Assuncao y col., 2007a,b), como se demuestra por la disminución en el contenido de lipofuscina, un producto final de la peroxidación lipídica, cuyos niveles están aumentados en neuronas hipocampales tras el consumo de etanol.

Además, Watts y col. (2005) demostraron, mediante técnicas de co-cultivo, que los astrocitos protegen a las neuronas de la apoptosis inducida por etanol y que el mecanismo por el cual ejercen su acción protectora es mediante el mantenimiento de la homeostasis neuronal del glutatión, un

antioxidante intracelular. De nuevo se demuestra la implicación del estrés oxidativo en el mecanismo de neurotoxicidad inducido por etanol.

Otra evidencia ha sido aportada más recientemente por el grupo de Ku y *col.* (2006), quienes han sugerido que la hemo oxigenasa, enzima que controla el estado redox de la célula, protege a las neuronas hipocampales de la neurotoxicidad inducida por etanol. Observaron que la adición al medio de cultivo de un inhibidor de dicha enzima, junto con el etanol, incrementa el aumento de especies reactivas de oxígeno y la disminución de la viabilidad celular inducidos por etanol. Además, este efecto fue revertido por el co-tratamiento con bilirrubina, conocida por ser un potente antioxidante (Maines, 1988).

Por otro lado, el uso de melatonina, un atrapador de radicales libres, protege del daño neuronal inducido por etanol, disminuyendo la peroxidación lipídica y aumentando los niveles de glutathione (El-Sokkary y *col.*, 1999; Baydas y *col.*, 2005).

Además, no sólo los radicales libres de oxígeno, sino también los de nitrógeno, como el óxido nítrico, podrían estar implicados en el mecanismo de neurotoxicidad del etanol (Lancaster, 1992; 1995).

II. Hipótesis y Objetivos

El consumo de MDMA se produce en el contexto de un claro patrón de policonsumo, de tal forma que los consumidores de éxtasis emplean otras sustancias con una frecuencia elevada, entre las cuales destaca el etanol. El objetivo de esta Tesis Doctoral es evaluar algunas interacciones bioquímicas y comportamentales entre MDMA y etanol en roedores.

Las hipótesis de trabajo que se formularon son las siguientes:

1. Puesto que MDMA y etanol aumentan el estrés oxidativo cerebral y producen neurotoxicidad, parece razonable pensar que la pre-exposición a etanol podría potenciar la formación de radicales libres y la neurotoxicidad que induce la MDMA sobre los terminales nerviosos serotoninérgicos del cerebro de la rata.

2. El sistema dopaminérgico modula el consumo de etanol de tal manera que ratones *knockout* en los genes que codifican para el transportador de dopamina muestran un consumo de etanol más elevado que los correspondientes controles. Puesto que la MDMA induce en el ratón, a largo plazo, un efecto neurotóxico sobre el sistema dopaminérgico que se refleja en una reducción en el contenido estriatal de dopamina y en la densidad del transportador, hipotetizamos que los animales sometidos a un régimen neurotóxico de MDMA mostrarán un consumo y preferencia por etanol que será mayor que aquellos no lesionados con MDMA. Además, puesto que la sensibilidad al etanol se correlaciona negativamente con el consumo de etanol en humanos y roedores, pensamos que la lesión dopaminérgica inducida por MDMA no solamente aumentará el consumo y preferencia por etanol, sino que también convertirá a los ratones en resistentes a los efectos agudos del etanol.

Para comprobar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS GENERALES

1^{er} Objetivo

Determinar si la exposición previa e intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma potencia la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por una dosis baja de MDMA en el cerebro de la rata, cuando se administra a una temperatura ambiente elevada.

2^o Objetivo

Determinar si la administración de una dosis neurotóxica de MDMA, que produce una hipofunción dopaminérgica en el cerebro de ratón, induce un aumento en el consumo y preferencia por etanol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1^{er} Objetivo

1.1. Optimizar el método de administración de etanol a la rata mediante cámaras de inhalación y determinar la concentración plasmática de etanol.

1.2. Examinar el efecto de la pre-exposición intermitente a dosis elevadas de etanol sobre la hipertermia y la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA sobre los terminales serotoninérgicos.

1.3. Determinar la implicación de los radicales libres en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

1.4. Investigar la implicación del acetaldehído en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

2^o Objetivo

2.1. Estudiar el efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre el consumo y la preferencia por etanol del ratón.

2.2. Evaluar el efecto de agonistas y antagonistas D₁ sobre el consumo y preferencia por etanol en ratones pre-expuestos a una dosis neurotóxica de MDMA.

2.3. Determinar la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por la administración aguda de etanol en ratones pre-tratados con MDMA.

2.4. Determinar el efecto de la MDMA sobre la densidad de los receptores de dopamina D₁ y D₂ en el núcleo accumbens y caudado-putamen.

2.5. Evaluar el consumo de sacarosa y quinina en ratones pre-tratados con una dosis neurotóxica de MDMA para descartar efectos debidos a cambios en preferencia de sabor o necesidades calóricas.

2.6. Investigar la relación entre el consumo de etanol y el efecto estimulante de la actividad locomotora inducido por etanol en ratones pre-tratados con MDMA, para descartar que una sensibilización a los efectos del etanol debida a la MDMA pudiera ser responsable del aumento en el consumo de etanol.

2.7. Estudiar si el aumento en el consumo y la preferencia por etanol inducido por una dosis neurotóxica de MDMA está relacionado con el estado de ansiedad que produce la droga.

2.8. Determinar la sensibilidad al efecto hipnótico/sedante del etanol y el desarrollo de tolerancia aguda a la hipotermia inducida por etanol en ratones pre-tratados con una dosis neurotóxica de MDMA.

2.9. Determinar los niveles plasmáticos de etanol durante 5 h después de su administración en ratones tratados y no tratados con MDMA, para descartar efectos relacionados con cambios en las propiedades farmacocinéticas del etanol.

2.10. Confirmar, en cada uno de los protocolos experimentales, la disminución en el contenido de dopamina y en la densidad del transportador de dopamina en el estriado de ratones inyectados con una dosis neurotóxica de MDMA.

III. Material y Métodos

1. Animales utilizados.

Se utilizaron ratas macho adultas Dark Agouti (figura 6) con un peso inicial comprendido entre 150-180 g y ratones macho adultos C57BL/6J (figura 7) con un peso inicial comprendido entre 20-25 g (*Harlan Ibérica*, Barcelona). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad (50-55 %), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y teniendo libre acceso a comida y agua, en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid.

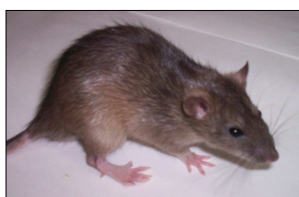


Figura 6: Rata de la especie Dark Agouti



Figura 7: Ratón de la especie C57BL/6J

Todos los experimentos de esta Tesis Doctoral se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense y conforme a la Regulación Europea y Española (DCUE86/609/CEE, RE 223/1988 y OEM 13/X/1989).

2. Diseño experimental.

2.1. Estudio del efecto de la pre-exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma sobre la lesión serotoninérgica inducida por MDMA en el cerebro de la rata.

En la figura 8 se muestra un esquema del sistema experimental utilizado. El sistema consiste en una bomba de flujo regulable (*Harvard Apparatus*, EE.UU.) que transfiere etanol líquido hasta un matraz situado en un baño de agua, que mantiene una temperatura constante de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este mismo matraz tiene una entrada de aire, el cual, mediante un rotámetro, incide sobre el etanol líquido a una velocidad de 600 l/h, vaporizándolo. Los vapores de etanol salen hacia una cámara sellada de 37 litros de capacidad, dispuesta de ventilador para asegurar una homogénea distribución de los vapores, donde se introducen los animales que van a ser expuestos a etanol. El etanol fue sustituido por agua en los animales controles.

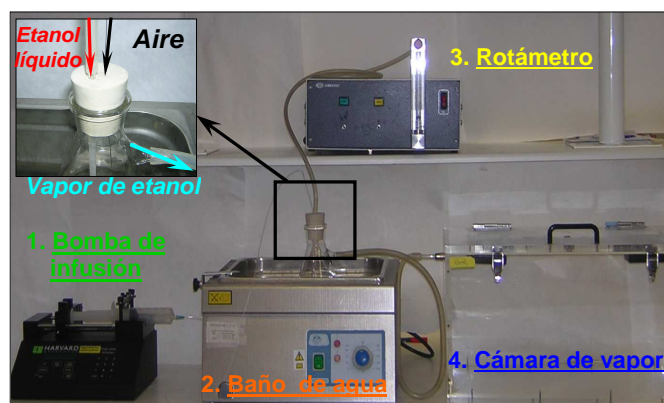


Figura 8: Representación esquemática del sistema de inhalación de vapores de etanol.

2.1.1. Optimización del método de administración de etanol a la rata mediante cámaras de inhalación.

El objetivo de este ensayo fue determinar si existe una relación lineal entre la velocidad a la cual es bombeado el vapor de etanol a la cámara de inhalación y la concentración de etanol en plasma. Para ello, los animales fueron colocados en la cámara de inhalación y expuestos durante 3 h a etanol bombeado a distintos flujos (0.25 - 1.75 mL/min). Transcurrido este tiempo, se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales y se determinó la concentración de etanol en plasma para cada flujo de etanol.

Este estudio permitió además elegir un flujo que produjera concentraciones de etanol en plasma de aproximadamente 450 mg/dL. Esta concentración de etanol en plasma fue seleccionada para mimetizar el consumo de ciertos sectores de la sociedad que ingieren de manera repetida altos niveles de etanol en un intervalo corto de tiempo, desarrollando un cuadro de intoxicación severa (Doyle y col., 1994; Parke y col., 1996; Whiteman y col., 2000).

2.1.2. Efecto del etanol sobre la hipertermia y la neurotoxicidad inducida por MDMA.

Las ratas fueron expuestas a concentraciones de etanol en plasma de 450 mg/dL antes de la administración de la MDMA. Para ello, el etanol o aire fue bombeado a la cámara de inhalación a un flujo de 1 mL/min durante cuatro días consecutivos (3 h/día), previos a la administración de la MDMA o de salino. Se midió la temperatura rectal de los animales antes de colocarlos en la cámara de inhalación e inmediatamente después de sacarlos de la misma. Los niveles de etanol en plasma fueron cuantificados diariamente tras las 3 h de exposición a vapores de etanol (*ver apartado 3*). Veinticuatro horas después de la última exposición a etanol, las ratas fueron colocadas en una habitación mantenida a 28-30 °C durante 2,5 h antes de la administración de la MDMA (5 mg/kg, i.p.) y hasta 6 h después. La temperatura rectal se midió durante 1,5 h antes de la administración de la

MDMA y hasta 6 h después. A continuación, las ratas se colocaron a 21 °C hasta el final del estudio. Siete días después de la administración de la MDMA, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos para evaluar la neurotoxicidad (figura 9).

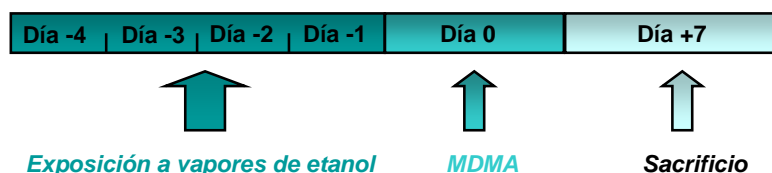


Figura 9: Esquema del protocolo de co-administración de etanol y MDMA.

Para comprobar que es necesaria una exposición a etanol prolongada para potenciar los efectos de la MDMA, los animales fueron expuestos a vapores de etanol durante un único día (3 h/día), 24 h antes a la administración de la MDMA o de salino. El etanol se bombeó a un flujo de 1,0 mL/min y la MDMA se administró a una dosis de 5 mg/kg, i.p. y a una temperatura ambiente de 30 °C. De nuevo, 7 días después de la administración de la MDMA, se sacrificaron los animales para evaluar la neurotoxicidad.

2.1.3. Implicación de los radicales libres en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

Dado que es el hipocampo la estructura cerebral en la que más se observa el potenciamiento producido por el etanol sobre el daño inducido por MDMA, se determinó la formación de radicales hidroxilo en el hipocampo de ratas expuestas y no expuestas a etanol. Para ello se implantó una cánula guía en el hipocampo 3 días antes de la exposición a etanol y las sondas de microdiálisis fueron insertadas en la cánula guía el día de la administración de la MDMA (24 h después de la última exposición a etanol) (*ver apartado 7.2.*).

2.1.4. Implicación del acetaldehído en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

Un grupo de animales expuestos a etanol fue inyectado con cianamida (50 mg/kg, i.p.) o salino 30 minutos antes de colocarlos en la cámara de inhalación, los días 1 y 3 de los 4 días de exposición a etanol (figura 10). Esta dosis de cianamida incrementa los niveles de acetaldehído en comparación con aquellos observados en ratas que reciben únicamente etanol (Kinoshita y col., 2002). El resto del protocolo experimental fue desarrollado de la misma manera que en el estudio 2. Los niveles de acetaldehído en plasma se determinaron diariamente tras las 3 h de exposición a etanol (*ver apartado 4*).

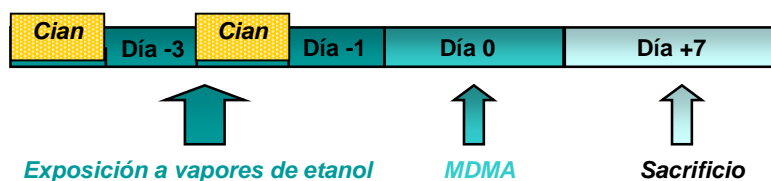


Figura 10. Esquema de la administración de cianamida durante la exposición a etanol.

2.2. Estudio del efecto producido por la lesión dopaminérgica inducida por MDMA en el cerebro de ratón sobre el consumo y la preferencia por etanol.

2.2.1. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre el consumo y la preferencia por etanol del ratón.

El consumo voluntario y la preferencia por etanol fueron estudiados usando el modelo de libre elección de dos botellas (Naassila y col., 2002). Los fluidos se suministraron por medio de pipetas serológicas de plástico de 25 mL graduadas a intervalos de 0,2 mL (la construcción de los tubos de bebida se realizó siguiendo el método de Tordoff y Bachmanov (2005) explicado en detalle en la página web www.monell.org/MMTPP (figura 11A)).

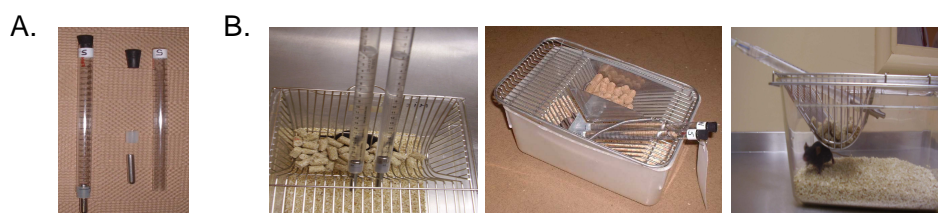


Figura 11: Representación del modelo de libre elección de dos botellas.

Tres días después de la administración de la MDMA o salino, los animales fueron colocados individualmente en jaulas de policarbonato (tipo 2, 22 cm longitud x 16,5 cm ancho x 14 cm alto, superficie del suelo 363 cm², EH-II-1264, EHRET GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, Alemania) para ratón, teniendo libre acceso a comida, y fueron habituados a beber durante 4 días de dos pipetas de 25 mL, conteniendo agua corriente, colocadas en la tapa de la jaula (Figura 11B).

Los animales tratados con salino (*Grupo I*) y MDMA (*Grupo II*) fueron entonces divididos en dos grupos (*a* y *b*). Los animales de los grupos *Ia* y *IIa* tuvieron acceso a dos pipetas conteniendo agua corriente mientras que los animales de los grupos *Ib* y *IIb* tuvieron acceso también a dos pipetas, en este caso una conteniendo agua corriente y la otra una solución de etanol en agua. Las concentraciones de etanol (v/v) fueron incrementando cada 7 días, a fin de lograr una habituación progresiva que permita valorar la ingesta de un modo semejante al del consumo en humanos. Los animales recibieron soluciones de 3, 6, 10 y 20 % (v/v) de etanol en agua en el curso del experimento.

Todas las soluciones de bebida fueron renovadas cada 2 días, tiempo al cual se cambió la posición de las pipetas para evitar preferencias de lugar que pudiesen afectar al consumo, y se midió diariamente la ingesta de líquidos. Los días 4 y 7 de cada intervalo de 7 días, se determinó la ingesta de comida ($\text{g/kg}_{\text{peso corporal}}$), el peso corporal y la temperatura rectal de los animales. El consumo de agua se midió a lo largo del experimento. Para obtener una medida del consumo de etanol corregida para diferencias individuales del tamaño del animal, se calcularon los gramos de etanol consumidos por kilogramo de peso corporal por día ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{peso ratón}}/\text{día}$), para cada ratón, todos los días, y se determinó la media del consumo de etanol por día para cada concentración de etanol.

La preferencia por etanol se calculó para cada concentración de etanol como el cociente entre el volumen de la solución de etanol consumido y el volumen total de fluido ingerido (volumen de etanol + volumen de agua) y se valoró en tres categorías: baja, intermedia o alta, según si la proporción anterior era menor o igual a 35 %, entre 35-70 % o igual o superior a 70 % respectivamente (O'Callaghan y col., 2002).

Finalmente, las jaulas se limpiaron cada 7 días, en el medio de cada bloque de etanol, para evitar interacciones con cambios en las concentraciones de etanol.

2.2.2. Efecto de agonistas y antagonistas D_1 sobre el consumo y preferencia por etanol en ratones pre-expuestos a dosis neurotóxicas de MDMA.

Para evaluar la hipótesis de que la disminución de la concentración de dopamina, inducida por MDMA, es responsable de los cambios observados en el consumo de etanol en ratones lesionados con MDMA, se llevaron a cabo experimentos farmacológicos con el agonista de receptores D_1 , SKF81297, y el antagonista de D_1 , SCH23390. En estos experimentos, los ratones recibieron soluciones conteniendo 3 % (durante 7 días), 6 % (durante 7 días) y 10 % (durante 14 días) de etanol. SKF81297 (1 mg/kg, i.p.) y SCH23390 (100 $\mu\text{g/kg}$, i.p.) fueron administrados diariamente durante la primera y segunda semana, respectivamente, de la exposición a etanol al 10 %. Ambos compuestos fueron disueltos en salino e inyectados en un volumen de 10 mL/kg, 30 min antes del comienzo del ciclo de oscuridad. Los ratones control recibieron salino. Las dosis utilizadas de los agentes dopaminérgicos se han mostrado eficaces para estudiar comportamientos mediados por dopamina en el ratón (Silvestre y col., 1996; Cohen y col., 1997; Liu y Weiss, 2002).

2.2.3. Efecto de la MDMA sobre la liberación de dopamina inducida por etanol en el núcleo accumbens.

Para determinar si existen diferencias en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por etanol entre animales tratados con MDMA o salino que pudiesen explicar las diferencias en el consumo de etanol, animales tratados 6 días antes con salino o MDMA, fueron implantados con

una cánula guía. A las 24 h de la implantación, las sondas de diálisis fueron insertadas en la cánula guía (*ver apartado 7.1.*) y los animales fueron inyectados con etanol (20 % p/v) a una dosis de 3 g/kg.

2.2.4. Efecto de la MDMA sobre la densidad de los receptores de dopamina D_1 y D_2 en el núcleo accumbens y caudado-putamen.

Una disminución en el contenido de DA normalmente conduce a un incremento en la densidad de receptores D_1 en diferentes modelos experimentales (Pope-Coleman y *col.*, 2000; Betabert y Greenamyre, 2004). Por otro lado, una disminución en la densidad de los receptores D_2 presinápticos como resultado de la pérdida de terminales dopaminérgicos, daría lugar a una regulación al alza de dichos receptores a nivel post-sináptico. Así, este experimento se realizó para comprobar si la disminución en el contenido de DA inducida por MDMA es consistente con una regulación al alza de receptores D_1 y D_2 en el caudado-putamen y en el núcleo accumbens.

Para ello, 1 y 4 semanas después de la inyección de la MDMA, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos y rápidamente congelados por inmersión en isopentano preenfriado con hielo seco. Los cerebros congelados se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día del ensayo (*ver apartado 8.*).

2.2.5. Test de consumo de sacarosa y quinina.

Este test se realizó para descartar que la preferencia por etanol estuviese afectada por factores tales como preferencias de sabor o aumento de los requerimientos energéticos. Los animales tratados con salino y con MDMA 3 días antes, fueron colocados en jaulas individuales y habituados a beber durante 4 días de dos pipetas conteniendo agua corriente. A continuación, tuvieron acceso a dos pipetas, una conteniendo agua corriente y la otra una solución de sacarosa o quinina, usando un protocolo similar al descrito para el consumo de etanol.

Se ensayaron 4 concentraciones ascendentes de sacarosa: 0,017, 0,17 y 1,7 y 4,25 % y 2 concentraciones de quinina: 0,03 y 0,1 mM, de acuerdo con protocolos descritos previamente (Lewis y *col.*, 2005; Naassila y *col.*, 2002). Los ratones tuvieron 4 días de acceso a cada solución. La preferencia para cada solución, sacarosa o quinina, fue calculada dividiendo el volumen de la solución de sabor consumido entre el volumen total de fluido consumido ($\text{Preferencia} = \text{Vol}_{\text{solución de sabor}} / \text{Vol}_{\text{agua + solución de sabor}}$).

Al igual que en el estudio de preferencia de etanol, se cuantificó la ingesta de alimento y se controló el peso corporal y la temperatura rectal durante todo el desarrollo del experimento.

2.2.6. Efecto de la MDMA sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Existe una correlación entre la sensibilización a la hiperactividad locomotora producida por etanol y la ingesta del mismo (Grahame y col., 2000; Lessov y col., 2001). Para descartar que la sensibilización a los efectos del etanol pudiera ser responsable del aumento en el consumo de etanol, se midió la actividad locomotora 3 semanas después de la MDMA, tiempo al cual el consumo en ratones pre-tratados con MDMA fue más alto que los inyectados con salino.

El test se desarrolló en una arena abierta (26 x 21, 10 cm de altura), con el fondo y los laterales de metacrilato, cubiertos con un material marrón no reflectante. El comportamiento del ratón fue grabado en 8 arenas corriendo en paralelo mediante una videocámara (Modelo Sony CCD-IRIS con una lente 1:14) situada sobre las arenas y conectada a un monitor de video (Modelo Sony PVM-145E) y un grabador (Modelo Panasonic AG-5700). Se utilizó una luz tenue para minimizar las sombras en las arenas. Se colocó a los ratones en la habitación experimental el día anterior al experimento. En este día, los ratones tratados con MDMA o salino recibieron una inyección de etanol 1 g/kg (20 % p/v en salino) e inmediatamente después se colocaron en la arena. El comportamiento de los animales se grabó durante 30 min y después fueron devueltos a sus jaulas. Los ensayos fueron desarrollados entre las 10:00 y las 14:00 h. Las grabaciones fueron analizadas automáticamente mediante el programa EthoVision (versión 1.70, *Noldus Information Technologies*), que determina la distancia recorrida (cm) durante el periodo total de observación y a intervalos de 10 minutos.

2.2.7. Efecto de la MDMA sobre el nivel de ansiedad.

El nivel de ansiedad de los animales se determinó mediante el test de la “caja clara-oscuro”. Este test se desarrolló 3 semanas después de la administración de la MDMA y salino para determinar si los animales pre-tratados con MDMA muestran un comportamiento ansioso que explique el mayor consumo de etanol, dadas las propiedades ansiolíticas del etanol (Stewart y col., 1993). El ensayo está basado en la aversión innata de los roedores a los lugares espléndidamente iluminados y en el comportamiento espontáneo (o tendencia) a explorar ambientes nuevos (Crawley y Goodwin, 1980). Las drogas que incrementan el tiempo que pasan los animales en el compartimento claro y disminuyen la latencia de la primera transición, son consideradas ansiolíticas, mientras que las drogas que producen el modelo contrario son consideradas ansiogénicas.

La caja clara-oscuro se colocó en una habitación oscura. Estaba formada por dos compartimentos, uno oscuro (de policloruro de vinilo negro opaco, 20 x 24 x 14 cm) y otro claro (de metacrilato, 20 x 24 x 14 cm), conectados por un túnel (5 x 7 x 10 cm) oscuro. Veinticinco centímetros por encima del suelo, se colocó una luz blanca, de 60-W, para proporcionar una iluminación directa al compartimento claro. Al principio del ensayo, el ratón fue individualmente

situado en el compartimento oscuro, con la cabeza mirando hacia el compartimento claro, y el comportamiento del ratón se grabó en una videocámara durante 5 min. Se cuantificó la latencia de la primera transición, el tiempo total pasado en cada compartimento y el número total de transiciones entre los dos compartimentos. Se consideró que el ratón entraba en un compartimento cuando ambas patas delanteras y traseras están dentro de la cámara.

2.2.8. Efecto de la MDMA sobre la sensibilidad al efecto hipnótico/sedante del etanol.

Puesto que la sensibilidad al etanol se correlaciona negativamente con el consumo de etanol en humanos y roedores, hipotetizamos que la lesión dopaminérgica inducida por MDMA no solamente aumentará el consumo y preferencia por etanol, sino que también convertirá a los ratones en resistentes a los efectos agudos del etanol. La evaluación de la sensibilidad al efecto hipnótico/sedante del etanol se llevó a cabo midiendo la duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento, siguiendo un procedimiento similar al utilizado por Harris y col. (1995b).

Los animales tratados con MDMA y salino fueron inyectados 7 días después con etanol (20 % p/v en salino, i.p.) a una dosis de 2,5 ó 3 g/kg. Una vez que los animales se volvieron atáxicos, cada ratón se situó en posición invertida (apoyado sobre su espalda) sobre una superficie en forma de U. Se cuantificó el tiempo (en minutos) que transcurre entre el comienzo de la sedación inducida por etanol y el momento en que el ratón se incorpora sobre sus 4 patas, 3 veces en un intervalo de 30 segundos. Este tiempo fue utilizado como un índice del tiempo necesario para recuperar el reflejo de enderezamiento.

2.2.9. Efecto de la MDMA sobre la tolerancia a la hipotermia inducida por etanol.

La hipotermia inducida por etanol se ha usado ampliamente como modelo para estudiar el fenómeno de tolerancia. El procedimiento seguido para medir la rápida tolerancia a la hipotermia inducida por etanol fue similar al descrito por Crabbe y col. (1979), en términos de intervalos entre inyecciones y dosificación. Así, animales tratados con MDMA o salino 7 días antes, fueron separados aleatoriamente en tres grupos. En el día 1, los dos primeros grupos fueron inyectados con salino y el tercer grupo recibió etanol (20 % p/v en salino, i.p.) a una dosis de 3 g/kg. En el segundo día, se midió la temperatura rectal de todos los animales y a continuación, el grupo 1 fue inyectado con salino y los grupos 2 y 3 recibieron etanol (3 g/kg, i.p., 20 % p/v en salino). Se monitorizó la temperatura rectal empezando 30 minutos antes de la inyección y hasta 3 h después (tabla 3).

Pretratamiento (7 días previos)	Tratamiento	
	Día 1	Día 2
SALINO (NaCl 0,9 %) (10 mL/kg, i.p., 3 veces con un intervalo de 3 h)	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %
	NaCl 0,9 %	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg
	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg
MDMA 30 mg/kg (10 mL/kg, i.p., 3 veces con un intervalo de 3 h)	NaCl 0,9 %	NaCl 0,9 %
	NaCl 0,9 %	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg
	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg	Etanol (20 % p/v) 3 g/kg

Tabla 3. Esquema para la determinación de la tolerancia a la hipotermia inducida por etanol.

2.2.10. Efecto de la MDMA sobre los niveles de etanol en plasma.

Para determinar si existen diferencias en el metabolismo del etanol entre animales tratados con MDMA y salino que pudiesen explicar las diferencias en el consumo de etanol, 7 días después de la administración de la MDMA o salino, los ratones fueron inyectados con etanol (20 % p/v, i.p.) a una dosis de 3 g/kg. Se recogieron de la cola del animal muestras seriadas de 20 µL de sangre, en capilares heparinizados, a los 30, 60, 120, 180, 240 y 270 minutos después de la inyección de etanol (ver apartado 3).

2.2.11. Efecto de la MDMA sobre la concentración de DA y la densidad de los lugares de recaptación de DA (DAT).

Después de las 4 semanas de exposición a etanol, se determinó la concentración de DA y sus metabolitos, DOPAC y HVA, así como la densidad de los lugares de recaptación de DA (DAT) en el estriado para evaluar el efecto de la MDMA sobre los terminales dopaminérgicos y comprobar si este efecto es alterado por la exposición a diferentes concentraciones de etanol (ver apartado 6.1. y 6.3.).

Además, al final de cada protocolo experimental descrito, se determinó la concentración estriatal de DA y sus metabolitos con el fin de comprobar la disminución a largo plazo del contenido de dopamina inducida por MDMA. Para ello, los animales fueron sacrificados por decapitación, sus cerebros extraídos y diseccionado el estriado sobre hielo picado (ver apartado 6.1.).

3. Determinación de la concentración de etanol en plasma.

Muestras de 20 µL de sangre fueron recogidas de la cola del animal utilizando capilares heparinizados, se centrifugaron durante 6 min (Microcentrifuge MK5, modelo 01400-00, Analox, U.K.) y se inyectaron en un analizador (AM1, Analox, U.K.). Este ensayo está basado en la oxidación

del etanol por la enzima alcohol oxidasa en presencia de oxígeno molecular. Bajo condiciones apropiadas, la velocidad máxima de consumo de oxígeno es directamente proporcional a la concentración de etanol. Los niveles de etanol en plasma fueron expresados en mg/dL, usando como estándar etanol 300 mg/dL.

4. Determinación de los niveles plasmáticos de acetaldehído.

Los niveles plasmáticos de acetaldehído se determinaron diariamente tras las 3 h de exposición a vapores de etanol. Dicha determinación se realizó por h.p.l.c. usando una modificación del método descrito por Kozutsumi y col. (2002). Se recogieron 100 μ L de sangre en tubos heparinizados y se desproteinizaron por la adición de 300 μ L de ácido perclórico 3 M, seguido de la adición 800 μ L de acetato de sodio 3 M para prevenir la bajada de pH debida al ácido. La mezcla se centrifugó a 1500 x g (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralte, EE.UU.) durante 10 min a una temperatura de 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 500 μ L del derivatizante 2,4-dinitrofenil hidracina 5 mM (DNPH), en buffer acetato 0,1 M pH 4 – DMSO (16:9). Se dejó a la mezcla reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 μ L de una solución de n-butiraldehído-DNPH 20 μ M en metanol como estándar interno, antes de la purificación por extracción en fase sólida con columnas C18 (Sep-Pak® Vac 1cc, Waters). Las columnas fueron previamente acondicionadas con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua. A continuación, se aplicó la mezcla de reacción y después de lavar con 1 mL de agua seguido de 1 mL de metanol 50 % para eliminar el exceso de derivatizante, el derivado acetaldehído-DNPH y el estándar interno se eluyeron con 2 mL de metanol. La fracción recuperada se secó mediante una corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 0,1 mL de fase móvil, compuesta por acetonitrilo y agua (65:35). Ambos picos, acetaldehído-DNPH y n-butiraldehído-DNPH, fueron detectados por h.p.l.c. con detección ultravioleta-visible a una absorbancia de 365 nm.

El sistema de h.p.l.c. utilizado incluyó una bomba (Waters 510) conectada a un inyector manual (Volumen de inyección = 20 μ L, Rheodyne), una columna de fase reversa C₈ (5 μ m; 250 x 4,6 mm; Phenomenex, EE.UU.), con precolumna, y un detector ultravioleta-visible (Waters 2487) conectado a una unidad de integración (Unipoint, Gilson). La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo y agua en la proporción 65:35 y fue filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0,22 μ m, Waters) y desgasificada mediante burbujeo constante de helio (Air Liquide, España). El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min y la detección se realizó a una longitud de onda de 365 nm. El tiempo de retención fue de 8 minutos y el resultado se expresó como mg/dL.

5. Medición de la temperatura rectal.

En los experimentos en que los animales se expusieron a vapores de etanol, la temperatura rectal se midió 3 veces con un intervalo de 30 min antes de introducirlos en la cámara y 3 h después de la exposición a etanol. En los experimentos en los que se administró MDMA, la temperatura rectal de los animales se midió 3 veces con un intervalo de 30 min antes de la administración de la droga y durante las 6 h siguientes a la administración de la MDMA en el caso de la rata o durante las 8 h siguientes en el caso del ratón. La monitorización se realizó mediante una sonda de temperatura acoplada a un lector digital (BAT12 thermometer, *Physitemp Instruments*, NJ, U.S.), con una resolución de $\pm 0,1$ °C y una precisión de $\pm 0,2$ °C, unido a un sensor RET-2 para roedores que se introduce 2,5 cm, en el recto de la rata, ó 2 cm, en el caso del ratón, mientras que el animal es ligeramente inmovilizado con la mano. La lectura se obtuvo durante los diez segundos siguientes a la introducción de la sonda en el recto.

6. Determinación de parámetros neuroquímicos en tejido cerebral.

6.1. Determinación de niveles cerebrales de monoaminas y metabolitos.

6.1.1. Extracción y preparación de muestras.

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación. Sus cerebros fueron extraídos y diseccionados sobre hielo picado. Se disecaron el hipocampo y la corteza frontal, en el caso de la rata, y el estriado, en el caso del ratón. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP 61S, *Sartorius*, Alemania). El tejido de ratón fue homogeneizado durante 15 s utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000U, *B. Braun Melsungen AG*, Alemania) en 500 μ L de una solución 0,2 M de ácido perclórico conteniendo cisteína 0,1 %, metabisulfito sódico 0,1 % y EDTA 0,01 %. El tejido de la rata se homogeneizó durante 15 s en diferentes volúmenes (750 μ L para hipocampo y 1 mL para un cuarto de la corteza total) de la solución de ácido perclórico anterior. Los hipocampos se homogeneizaron mediante ultrasonidos (Labsonic 2000U, *B. Braun Melsungen*, Alemania) y las cortezas mediante un homogenizador de varilla (Ultra-Turrax, *Janke & Kunkel*). El homogenado se centrifugó a 12.000 x g (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, *DuPont Instruments*, Giralte, EE.UUU.) durante 20 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante fue decantado y congelado a -40 °C hasta su posterior análisis.

6.1.2. Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos.

La cuantificación de la concentración de 5-HT, DA, DOPAC y HVA se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c.) con detección coulombimétrica. El sistema de h.p.l.c. utilizado incluyó una bomba (Waters 510) conectada a un inyector automático con

refrigeración (capacidad máxima de inyección = 200 μ L, Waters 712 WISP), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2; 5 μ m; 150 x 4,6 mm; Waters) con precolumna (Nova-Pak C18, Waters) y un detector coulombimétrico (Coulchem® III, ESA, EE.UU.) conectado a una unidad de integración (Unipoint, Gilson).

La fase móvil estuvo compuesta por KH_2PO_4 (0,05 M), ácido octanosulfónico (1 mM), EDTA (0,1 mM) y metanol 16 % en agua MilliQ ajustada a pH 3,7 (654 pH Meter, Metrohm, Suiza) con ácido fosfórico (H_3PO_4). La fase móvil fue filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0,22 μ m, Waters) y desgasificada con helio. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min, el potencial del electrodo de trabajo fue + 0,4 V y la sensibilidad de 500 nA para la determinación de 5-HT, DOPAC y HVA y de 2 μ A para la detección de DA.

Los estándares utilizados para la identificación y cuantificación de los picos fueron DA, DOPAC, HVA y 5-HT. Estos estándares se hicieron a partir de soluciones madre de 1 mg/mL en la mezcla de ácido perclórico anteriormente descrita (apartado 6.1.1.). La solución final contenía 25 ng/mL de 5-HT, 50 ng/mL de DOPAC, 100 ng/mL de HVA y 250 ng/mL de DA en ácido perclórico. Los tiempos de retención y el límite de detección fueron los indicados en la tabla 4. La concentración de 5-HT, DA, DOPAC y HVA se expresó en ng/g tejido.

	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (pg)
DOPAC	4,7	20
DA	5,4	70
HVA	10,3	1000
5-HT	11,6	50

Tabla 4. Tiempos de retención y límite de detección de monoaminas y sus metabolitos.

6.2. Determinación de lugares de recaptación de 5-HT marcados con [^3H]-paroxetina.

La cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT fue llevado a cabo por el método descrito por Hewit y Green (1994). Paroxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT y el proceso de fijación de [^3H]-paroxetina se utiliza como marcador del daño producido por la MDMA. Estudios previos han demostrado que la MDMA provoca cambios sobre la B_{max} (densidad de los lugares de recaptación de 5-HT), pero no altera la K_D (la afinidad de los lugares de recaptación de 5-HT) (Nichols y col., 1982; Battaglia y col., 1987), lo que permitió utilizar una sola concentración de saturación de [^3H]-paroxetina (Battaglia y col., 1988) para la determinación de la neurotoxicidad inducida por la MDMA 7 días después de su administración. Puesto que estos lugares de recaptación de 5-HT se encuentran en los terminales nerviosos que contienen 5-HT, su

disminución es indicativa de la pérdida de terminales y/o axones serotoninérgicos (Green y col., 1995).

6.2.1. Extracción y purificación de las muestras.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitación. Una vez abierto el cráneo, se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo en un tiempo inferior a 4 min. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP 61S, Sartorius AG, Alemania).

El hipocampo y la corteza de los animales se homogeneizaron durante 15 segundos utilizando un homogeneizador de varilla (Ultra-Turrax, Janke & Kunke) en 2 y 5 mL, respectivamente, de una solución tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), que contenía: NaCl 120 mM y KCl 5mM. El homogenado se centrifugó a 30.000 x g durante 10 min a una temperatura de 4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giral, EE.UU.). El sobrenadante se desechó y este proceso de lavado se repitió dos veces más. El precipitado final se resuspendió en la solución de tampón Tris-HCl hasta una concentración de 10 mg tejido/mL. En esta solución diluida se determinó la concentración de proteína (Lowry y col., 1951).

6.2.2. Fijación de [³H]-paroxetina

Alícuotas (800 µL) de esta suspensión de membranas diluida a 10 mg tejido/mL fueron llevadas a tubos que contenían [³H]-paroxetina 1 nM (con actividad específica de 21,5 Ci/mmol), en ausencia y en presencia de 5-HT 10 µM para la determinación de la unión total o inespecífica, respectivamente. La fijación total e inespecífica se realizó por triplicado. Las muestras fueron incubadas durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, se filtraron a través de filtros (Whatman GF/B, Skatron) pretratados con 0,05 % polietilenimina, utilizando un Semiautomatic Cell Harvester (Skatron, Noruega). Una vez secos, los filtros fueron transferidos a viales a los que se añadieron 2 mL de líquido de centelleo (Emulsifier-Safe, Packard Instruments BV, Holanda) y se conservaron toda la noche en oscuridad. Se usaron como estándares tubos que contenían 100 µL de [³H]-paroxetina (10 nM) y 2 mL de líquido de centelleo. La radioactividad fue medida al día siguiente por espectrometría de centelleo (Tricarb® Liquid Scintillation Analyzer, Model 2500, Packard Instrument Company, EE.UU.).

6.2.3. Determinación de la concentración proteica.

La concentración proteica fue medida mediante el método de Lowry y col. (1951). Se pipetearon 20 µL de la preparación de donde se quiere conocer el contenido proteico y 180 µL de agua desionizada. Se añadió a cada tubo 2 mL de una solución previamente preparada conteniendo sulfato de cobre (CuSO₄) 0,04 %, tartrato sódico (C₄H₄O₆Na₂·2H₂O) 0,07 %, sodio duodecil sulfato

(SDS) 0,69 % y carbonato sódico (Na_2CO_3) 1,96 %, en hidróxido sódico (NaOH) 0,1 N. Pasados 10 min, se añadieron 200 μL del reactivo de Folin (previamente diluido al 50 % con agua desionizada). Este proceso fue realizado para cada muestra y por triplicado. A la vez, una curva de concentración de estándares fue preparada siguiendo el mismo método, pero en lugar de homogenado, se utilizó suero de albúmina bovina (1 mg/mL); la curva tuvo unas concentraciones comprendidas entre 0-200 mg/mL de albúmina. Las muestras y la curva de estándares se incubaron a 22 °C durante 55 min y se cuantificaron en un espectrofotómetro (DU 530, *Beckman*, EE.UU.) a una longitud de onda $\lambda = 750 \text{ nm}$.

6.3. Determinación de lugares de recaptación de DA marcados con [^3H]-WIN 35,428

La cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de DA (DAT) fue llevado a cabo por una modificación del método descrito por Segal y *col.* (2003).

6.3.1. Extracción y purificación de las muestras.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitación. Una vez abierto el cráneo, se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo en un tiempo inferior a 4 min. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP 61S, *Sartorius AG*, Alemania).

El estriado de los animales se homogeneizó durante 15 segundos, utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000U, *B. Braun Melsungen AG*, Alemania), en 750 μL de una solución tampón de fosfato de sodio 20 mM conteniendo sacarosa 0,32 M. El homogenado se centrifugó a 30.000 x g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, *DuPont Instruments*, Giralt, EE.UU.). El sobrenadante se desechó y este proceso de lavado se repitió dos veces más. El precipitado final se resuspendió en 60 volúmenes de la solución de tampón fosfato-sacarosa. En esta solución final, se determinó la concentración de proteína como se indica en el apartado 6.2.3. (Lowry y *col.*, 1951).

6.3.2. Fijación de [^3H]-WIN 35,428.

Alícuotas de 100 μL (80 μg de proteína aproximadamente) de esta suspensión de membranas fueron llevadas a tubos que contenían [^3H]-WIN 35,428 5 nM (con actividad específica de 87 Ci/mmol), desipramina 300 nM y tampón fosfato-sacarosa hasta un volumen de reacción de 500 μL , en ausencia y en presencia de cocaína 30 μM , para la determinación de la unión total o inespecífica respectivamente. La fijación total e inespecífica se realizó por triplicado. Las muestras fueron incubadas durante 90 min a 4 °C. A continuación se filtraron a través de filtros (Whatman GF/B, *Skatron*) pretratados con polietilenimina 0,1 %, utilizando un *Semiautomatic Cell Harvester* (*Skatron*, Noruega). Una vez secos, los filtros fueron transferidos a viales a los que se añadieron 2 mL de líquido de centelleo (Emulsifier-Safe, *Packard Instruments BV*, Holanda) y se conservaron

toda la noche en oscuridad. Se usaron como estándares tubos que contenían 50 μL de [^3H]-WIN 35,428 (50 nM) y 2 mL de líquido de centelleo. La radioactividad fue medida al día siguiente por espectrometría de centelleo (Tricarb® Liquid Scintillation Analyzer, Model 2500, *Packard Instrument Company*).

7. Microdiálisis intracerebral “in vivo”.

La microdiálisis intracerebral *in vivo* permite extraer del espacio cerebral extracelular sustancias de bajo peso molecular. La técnica se basa en la implantación de una sonda de microdiálisis en un área concreta del cerebro que posteriormente es perfundida con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). El LCRa entra en contacto con el líquido extracelular a través de una membrana porosa y permeable al agua, estableciéndose un intercambio de solutos por difusión pasiva mediante un gradiente de concentración. Así, una sustancia presente en el espacio intersticial a una concentración más alta que dentro de la sonda, atravesaría la membrana y se incorporaría al fluido fisiológico que se está perfundiendo continuamente a través de la sonda de microdiálisis, permitiendo la recogida y posterior análisis cualitativo y cuantitativo de la sustancia obtenida.

7.1. Análisis cuantitativo de DA en el dializado estratial.

7.1.1. Anestesia e implantación de la cánula guía.

Los ratones fueron anestesiados con una solución de pentobarbital (Euta-Lender, 40 mg/kg, i.p.). El volumen de inyección fue de 10 mL/kg. Los animales anestesiados fueron colocados en un aparato de estereotaxia (Kopf®, *David Kopf Instruments*, EE.UU.) acoplado a un adaptador para ratón (modelo 921, *David Kopf Instruments*, EE.UU.) (figura 12), sujetos por los oídos y los dientes, y se cortó la piel del animal hasta dejar visible la base del cráneo. Las coordenadas para la implantación en el núcleo accumbens se calcularon mediante un atlas anatómico de cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 1997), tomando como referencia la línea bregma: anteroposterior +1,5 mm, mediolateral – 0,6 mm y dorsoventral -4 mm.

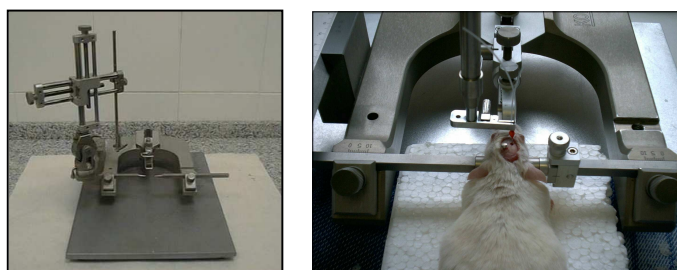


Figura 12: Aparato de estereotaxia acoplado a un adaptador para ratón.

Localizada la coordenada, se hizo una incisión en el cráneo con un torno dental (Micromotor 5750, Zenil, España), se desinfectó la zona con povidona yodada y se introdujo la cánula guía (CMA/7 Guide Cannula, CMA/Microdialysis, Suiza). Posteriormente, se fijó dicha cánula mediante dos microtornillos, pegamento cianoacrílico (Super Glue-3 Gel, Loctite España S.A.) y resina acrílica (DENTSPLY Limited, Reino Unido). Los animales operados salieron de la anestesia a los 10 minutos aproximadamente, manteniéndolos durante este tiempo bajo una luz infrarroja. Fueron alojados en jaulas individuales de metacrilato con base de cloruro de polivinilo (PVC) para microdiálisis (30 x 30 x 20 cm) (Servicio de Taller, Facultad de Físicas, U.C.M.) y se les dejó recuperarse de la operación 24 h.

7.1.2. Microdiálisis

En el día del experimento, se insertaron las sondas de diálisis (longitud de la membrana: 1.0 mm x 240 μ m; CMA/7, CMA/Microdialysis, Suiza) en las cánulas guía. La entrada de la sonda se conectó, a través de un pivote giratorio (Single channel 375 series swivle, Instech, EE.UU.), a un tubo de politeno (diámetro interior = 0,28 mm, diámetro exterior = 0,61 mm, Portex Ltd, Reino Unido), que a su vez estaba conectado a una bomba de precisión de microdiálisis (Pump 22, Harvard Apparatus, EE.UU.). Diversas jeringas (Hamilton Microliter™ Syringe, Hamilton, Suiza) se llenaron con LCRA (NaCl 125 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂·6H₂O 1,18 mM; CaCl₂·2H₂O 1,26 mM), previamente filtrado (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0,2 μ m, Waters) y desgasificado al vacío. El flujo fue de 1 μ L/min. Un tubo de 40 cm (FEP-Tubing, CMA/Microdialysis AB, Suecia) se conectó a la salida de la sonda. Una vez que el dializado comenzó a salir por el extremo del tubo de salida, se dejó estabilizar el sistema 1 h. Transcurrido este tiempo, se recogieron muestras cada 30 min en tubos que contenían 5 μ L de una solución de ácido perclórico 0,01 M, cisteína 0,2 % y metabisulfito sódico 0,2 % para evitar la degradación de DA. Las tres primeras muestras recogidas se tomaron como valores basales. El dializado se conservó a -80 °C hasta su análisis.

La diálisis continuó durante un total de 5 h, recogiendo un total de 12 muestras por ratón. Posteriormente, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital. La correcta localización de la sonda se verificó histológicamente con la perfusión de azul de metileno a través de la sonda para marcar el trayecto.

7.1.3. Cuantificación de la concentración de DA.

Las muestras de dializado se analizaron por h.p.l.c. con detección coulombimétrica. La fase móvil estaba compuesta por KH₂PO₄ (0,05 M), ácido octanosulfónico (0,4 mM), EDTA (0,1 mM) y metanol 16% en agua para h.p.l.c., ajustada a pH 3 con ácido fosfórico. La fase móvil fue filtrada

(filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0,2 μm , Waters) y desgasificada. El flujo fue de 1 mL/min y el potencial de la célula analítica fue de 400 mV con una sensibilidad de 1 μA para DA.

El sistema de h.p.l.c. consistió en una bomba (Waters 510) unida a un inyector manual (Volumen de inyección = 20 μL , Rheodyne), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2, 5 μm , 150 x 3,9 mm, Waters) con precolumna y detector coulombimétrico (Coulchem® III, ESA, EE.UU.). El estándar utilizado para la identificación y cuantificación del pico de DA se hizo en la solución de ácido perclórico anteriormente descrita (ver apartado 7.1.2.). La solución final contenía 50 ng/ml de DA en LCRa.

7.2. Determinación de radicales hidroxilo en el dializado hipocampal.

La formación *in vivo* de radicales libres en el cerebro fue medida por el método atrapador del salicilato descrito por Colado y col. (1997a) con algunas modificaciones. El fundamento de este método consiste en la reacción de 2 moléculas de ácido salicílico con radicales hidroxilo para formar los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) (figura 13). La formación de este último también puede ocurrir, por oxidación enzimática, en el hígado (Halliwell y col., 1991), por lo que se considera al 2,3-DHBA un mejor indicador de la formación de radicales hidroxilo (figura 13). La detección y cuantificación del ácido 2,3-DHBA por medio de h.p.l.c. con detección coulombimétrica, es una manera fiable de cuantificación indirecta de la formación de radicales hidroxilo (Radzik y col., 1983; Floyd y col., 1984).

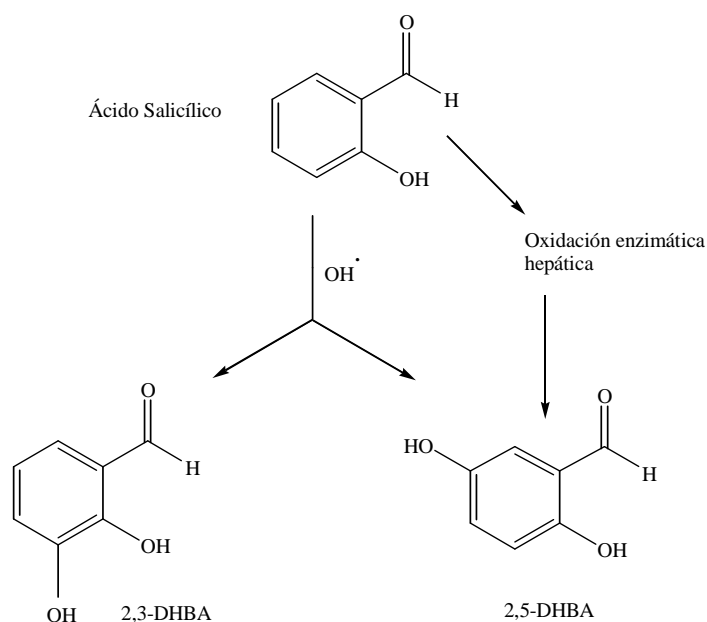


Figura 13: Formación de los ácidos 2,3-DHBA y 2,5-DHBA.

7.2.1. Anestesia e implantación de la cánula guía.

Las cánulas fueron implantadas en el hipocampo de la rata, tal y como se describe en el apartado 7.1.1., con alguna diferencia que veremos a continuación. Las coordenadas para la implantación de la cánula guía para rata (CMA/12 Guide Cannula, CMA/Microdialysis, Suiza) dentro del hipocampo se calcularon mediante un atlas anatómico de cerebro de rata para animal pequeño (König y Klippel, 1963), tomando como referencia la línea interaural (tabla 5).

	<i>Distancia a la línea interaural (cm)</i>
Coordenada	I.Hp.
Anteroposterior	+0,22
Mediolateral	-0,43
Dorsoventral	-0,40

Tabla 5: Coordenadas para la implantación intrahipocampal (I.Hp) desde la línea interaural.

7.2.2. Microdiálisis

La microdiálisis se llevó a cabo tal y como está descrita en el apartado 7.1.2. El LCRa fue modificado para incorporar una concentración de ácido salicílico de 2,5 mM (Colado y col., 2001). La composición de éste quedó como se detalla a continuación: NaCl 125 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂·6H₂O 1,18 mM; CaCl₂·2H₂O 1,26 mM; NaH₂PO₄·H₂O 0,5 mM; Na₂HPO₄·2H₂O 5mM; ácido salicílico 2,5 mM; pH = 6,55.

Las sondas de microdiálisis utilizadas para rata tuvieron las siguientes características: longitud de la membrana 4.0 mm x 500 µm (CMA/12 probe, CMA/Microdialysis, Suiza).

7.2.3. Cuantificación de la concentración de 2,3-DHBA.

Las muestras se analizaron por h.p.l.c. con detección coulombimétrica. La fase móvil utilizada tenía una composición de 0,025 M KH₂PO₄, 10 % metanol y 20 % acetonitrilo en agua para h.p.l.c., ajustada a pH 3,7 con ácido fosfórico, filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0,2 µm, Waters) y desgasificada al vacío. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el potencial de la célula analítica fue 400 mV con una sensibilidad de 1 µA. El sistema de h.p.l.c. consistió en una bomba (Waters 510) unida a un inyector manual (Volumen de inyección = 20 µL, Rheodyne), una columna de fase reversa (250 x 4.6 mm, 5 µm C8 Ultracarb, Phenomenex, EE.UU.) fijada a una precolumna (30 x 4.6 mm, 5 µm C8 Ultracarb, Phenomenex, EE.UU.) y un detector coulombimétrico (Coulchem® III, ESA, EE.UU.). La corriente fue monitorizada mediante un programa de ordenador (Unipoint, Gilson).

El estándar utilizado para la identificación y cuantificación de picos fue el ácido 2,3-DHBA. La solución madre de este estándar se preparó en 50 % metanol y 50 % agua desionizada. La solución final fue de 40 ng/mL en fase móvil. El tiempo de retención y el límite de detección para el 2,3-DHBA en las condiciones utilizadas fue de 5,4 min y 38 pg.

8. Autorradiografía cuantitativa de receptores D_1 y D_2 .

Una y 4 semanas después de la inyección de la MDMA, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos y rápidamente congelados por inmersión en isopentano preenfriado con hielo seco. Los cerebros congelados se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día del ensayo, día en el que se cortaron en secciones de $8\text{ }\mu\text{m}$ de grosor en un microtomo criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a lo largo del caudado-putamen (desde 1,0 mm anterior a bregma) y de la corteza y el núcleo del núcleo accumbens (desde 1,78 mm anterior a bregma), de acuerdo al atlas anatómico de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (1997).

Las secciones de cerebro fueron montadas en portas cubiertos de gelatina y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día del ensayo. Entonces, 3 secciones de cada nivel cerebral fueron incubadas a temperatura ambiente durante 60 min con [^3H]-SCH23390 1 nM (para receptores D_1) y [^3H]-YM09151-2 1 nM (para receptores D_2) en una solución tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), conteniendo NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1,5 mM y MgCl_2 4 mM. La unión inespecífica fue determinada en presencia de SCH23390 (D_1) o butaclamol 45 μM (D_2). Se lavaron rápidamente con la solución tampón Tris-HCl 50 mM a $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, a continuación, con agua H_2O_2 , y se secaron bajo corriente de aire frío. A continuación, las secciones de los ensayos de fijación, tanto las de D_1 como las de D_2 , se colocaron en casetes de rayos-X con [^3H]-microescalas como estándar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y en contacto con una película sensible a [^3H] ([^3H]-Hyperfilm, GE Healthcare). Tras 8 semanas de exposición a una temperatura de $4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, las películas fueron reveladas en D-19 (Kodak), fijadas y secadas. Todos los datos presentados fueron analizados desde las imágenes obtenidas. Se analizaron 3 portas por nivel (3 cortes/porta; 2 medidas/corte) para cada animal con un programa de dominio público (NIH Image software).

9. Herramientas farmacológicas. Características y procedencia.

Todas las dosis se expresan en términos de base libre.

- **MDMA:** (\pm) 3,4-metilenodioximetanfetamina

Se presenta en forma de polvo blanco. Se administró vía i.p. a una dosis única de 5 mg/kg y a una temperatura ambiente de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el caso de la rata, y a una dosis repetida de 30 mg/kg, 3 veces consecutivas con un intervalo de 3 h entre cada inyección y a temperatura ambiente, en el

caso del ratón. La droga se disolvió en una solución de suero salino (0,9 % p/v NaCl) y se administró en un volumen de 1 mL/kg en la rata y 10 mL/kg en el ratón.

La MDMA fue donada por el *National Institute on Drug Abuse* (N.I.D.A., Research Triangle Park, Carolina del Norte, EE.UU.) y también adquirida en *Ultrafine Chemicals Ltd.* (Manchester, Reino Unido).

➤ **ETANOL:**

Se utilizó etanol absoluto con una pureza del 99,5 %. Se administró de varias formas, como se detalla a continuación. En los experimentos en los que se administró el etanol en el agua de bebida, se utilizó etanol absoluto diluido en agua del grifo a concentraciones de 3, 6, 10 y 20 % (v/v). En los experimentos en los que el etanol se administró i.p., se utilizó etanol absoluto diluido en NaCl 0,9 % para obtener una solución de etanol del 20 % (p/v), variando las dosis de acuerdo a cada experimento, en un rango de 1,0 a 3,0 g/kg. El volumen de inyección fue de 10 mL/kg. Finalmente, en los experimentos en los que el etanol se administró mediante exposición a vapores de etanol, se utilizó etanol absoluto que fue evaporado mediante corriente de aire y temperatura de 42 °C.

El etanol se obtuvo de *Panreac* (España).

➤ **CIANAMIDA:**

La cianamida se obtuvo de *Sigma-Aldrich Química* (España). Se disolvió en solución salina (0,9 % p/v NaCl) y se administró i.p. a una dosis de 50 mg/kg y un volumen de inyección de 1 mL/kg, 30 min antes de la administración de la MDMA.

➤ **SKF 81297: Agonista Dopaminérgico**

El SKF 81297 se obtuvo de *Sigma-Aldrich Química* (España). Se disolvió en solución salina (0,9 % p/v NaCl) y se administró i.p. a una dosis de 1 mg/kg y un volumen de inyección de 10 mL/kg.

➤ **SCH 23390: Antagonista Dopaminérgico**

El SCH 23390 se obtuvo de *Sigma-Aldrich Química* (España). Se disolvió en una solución salina (0,9 % p/v NaCl) y se administró i.p. a una dosis de 0,1 mg/kg y un volumen de inyección de 10 mL/kg.

10. Otros reactivos químicos.

Obtenidos de ***Sigma-Aldrich Química (España)***: Acetaldehído (CH₃CHO), acetato de sodio (CH₃COONa), ácido octanosulfónico (sal sódica), 5-hidroxitriptamina (complejo de sulfato de creatinina; serotonina, 5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), ácido 3-hidroxitiramina (clorhídrico; 3,4-dihidroxifeniletilamina; dopamina, DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido

homoprotocatecuico; DOPAC), ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico; HVA), ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA), ácido ortofosfórico (H_3PO_4), ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), albúmina bovina, azul de metileno, carbonato sódico (Na_2CO_3), dimetilsulfóxido (DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH), fosfato monosódico hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), L-cisteína, n-butilaldehído-DNPH, quinina, reactivo Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent), sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), sulfato dodecil sódico (sulfato de lauril; SDS), Tris (hidroximetil) aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, Trizma®).

Obtenidos de **Merk (Alemania)**: Metanol para h.p.l.c. (CH_3OH), metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), potasio dihidrogenofosfato (KH_2PO_4), tartrato sódico dihidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sal sódica dihidrato del ácido etilendiaminotetraacético (Tritiplex® III; EDTA).

Obtenidos de **Panreac (España)**: Acetonitrilo, ácido acético (CH_3COOH), ácido clorhídrico (HCl), ácido perclórico (HClO_4), cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro magnésico 6 hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH), cobre II sulfato 5-hidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Obtenidos de **Perkin Elmer Boston MA (USA)**: [^3H]-paroxetina, [^3H]-SCH23390, [^3H]-YM09151-2.

Obtenido de **Packard Instruments BV (Holanda)**: Líquido de centelleo Emulsier-Safe.

Obtenido de **Amersham BioSci (UK)**: [^3H]-microsales, [^3H]-hyperfilm.

Obtenido de **Vetoquinol (España)**: Pentobarbital Dolethal®.

11. Tratamiento estadístico de los datos.

Los datos obtenidos de la determinación de aminas, de la densidad de lugares de recaptación de 5-HT y DA y de los receptores D_1 y D_2 , se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Newman-Keuls cuando se obtuvo un valor de F significativo, usando el programa de análisis de datos GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). El mismo método fue usado para comparar los datos obtenidos de la medida del reflejo de enderezamiento, de la rápida tolerancia a la hipotermia inducida por etanol, de la actividad locomotora y del efecto del agonista y antagonista D_1 sobre el consumo y preferencia por etanol.

El análisis estadístico de las medidas de temperatura y de la cuantificación de la concentración extracelular de 2,3-DHBA y de DA en el dializado cerebral se llevó a cabo utilizando el paquete informático de estadística BMDP/386 Dynamic (BMDP® Statistical Solutions, Cork, Eire). Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA): programa 2V cuando el número de observaciones fue igual en todos los grupos o programa 5V cuando el número de datos fue distinto. Se usó el tratamiento como factor entre sujetos y el tiempo como medida repetida. Este

método también se utilizó para comparar los datos obtenidos de las medidas del consumo y preferencia por etanol y del estudio del metabolismo del etanol.

El test de t-student fue usado para comparar el efecto de la exposición a etanol o aire sobre la temperatura rectal de los animales. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0,05$. Este test también se utilizó para comparar los niveles basales de DA en el dializado estriatal.

IV. Resultados

Estudio 1: Efecto del efecto de la pre-exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma sobre la lesión serotoninérgica inducida por MDMA en el cerebro de la rata.

1.1. Optimización del método de administración de etanol a la rata mediante cámaras de inhalación.

Este primer experimento fue llevado a cabo para ajustar la velocidad del flujo de etanol, con el fin de conseguir elevadas concentraciones de etanol en plasma. Flujos de 0,25, 0,5, 1, 1,5 y 1,75 mL/min produjeron los siguientes niveles de etanol en plasma (mg/dL): 26 ± 6 ($n = 4$), 168 ± 5 ($n = 4$), 509 ± 24 ($n = 4$), 675 ± 9 ($n = 4$) y 778 ± 17 ($n = 4$), respectivamente (figura 14). Hubo una relación lineal ($r^2 = 0.98$) entre el flujo de etanol y la concentración de etanol en plasma. En los experimentos siguientes se utilizó un flujo de etanol de 1 mL/min con el fin de obtener niveles plasmáticos de etanol de aproximadamente 450 mg/dL.

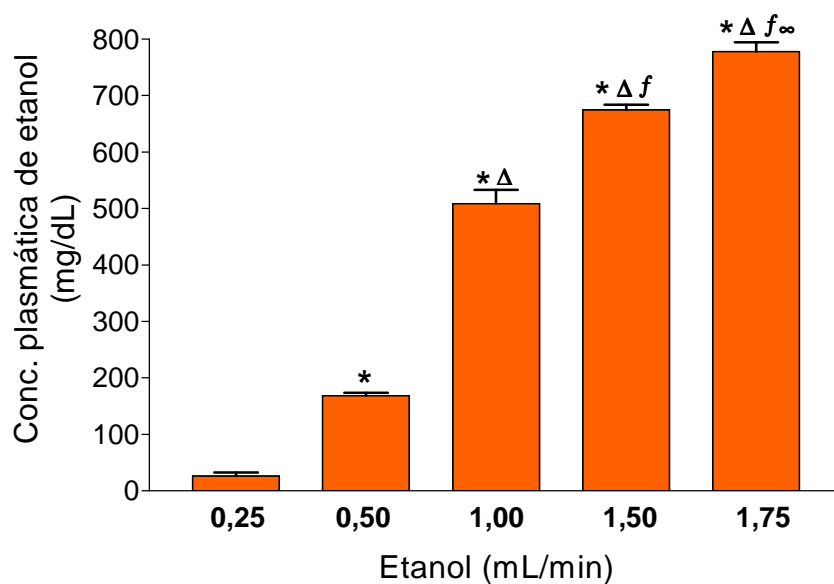


Figura 14. Efecto del flujo de etanol sobre la concentración plasmática de etanol. Los animales fueron colocados en la cámara de inhalación y expuestos durante 3 h a etanol bombeado a distintos flujos (0,25 – 1,75 mL/min). Transcurrido este tiempo, se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales y se determinó la concentración de etanol en plasma. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 4$). Diferencias respecto a flujo de 0.25: * $P < 0,001$. Diferencias respecto a flujo de 0.50: $^{\Delta}P < 0,001$. Diferencias respecto a flujo 1.0: $^fP < 0,001$. Diferencias respecto a flujo 1.5: $^{\infty}P < 0,001$.

1.2. Efecto de la exposición intermitente a etanol sobre la hipertermia y la neurotoxicidad inducida por MDMA.

La tabla 6 muestra las concentraciones diarias de etanol en plasma (409-480 mg/dL), medidas inmediatamente después de las 3 h de exposición a etanol bombeado a un flujo de 1 mL/min durante 4 días consecutivos. La media de la concentración de etanol en plasma fue 453 mg/dL (referida como 450 mg/dL).

Las ratas expuestas únicamente a aire humidificado (control) mostraron una reducción en la temperatura rectal de 1 °C tras las 3 h diarias de exposición a etanol (figura 15). Por otro lado, la exposición a vapores de etanol causó una reducción significativa en la temperatura rectal de los animales de aproximadamente 0,5 °C al final del primer día de tratamiento, en comparación con el grupo expuesto a aire ($36,1 \pm 0,09$ frente a $36,6 \pm 0,05$, $P < 0.001$). El resto de los días de exposición a etanol (días 2 a 4), la temperatura rectal de ratas tratadas con etanol fue similar a la observada en ratas expuestas a aire (figura 15). La temperatura dentro de la cámara (21 ± 2 °C) no difirió significativamente de la temperatura ambiente de la habitación ninguno de los 4 días de tratamiento.

La exposición a etanol indujo una ligera incoordinación de los movimientos voluntarios (*ataxia*) al final de cada tratamiento diario (3 h/día), en comparación con las ratas expuestas a aire humidificado. Los animales se recuperaron pasados 30 min tras la exposición y no mostraron espasmos 24 h después de la exposición a etanol (tiempo al cual se administró la MDMA). No obstante, estos efectos fueron observados visualmente, pero no fueron cuantificados.

La administración de una dosis de MDMA de 5 mg/kg, i.p., a animales mantenidos a una temperatura ambiente de 30 °C, produjo un incremento en la temperatura rectal de los mismos de aproximadamente 2 °C 30 min después de la inyección, respecto a los animales inyectados con salino; la hipertermia se mantuvo durante al menos 6 h (figura 16). Dicha hipertermia no fue modificada por la exposición a etanol durante los cuatro días previos a la administración de la MDMA (figura 16). Ratas tratadas con etanol e inyectadas con salino mostraron una temperatura rectal más alta que la de animales inyectados únicamente con salino (figura 16).

Siete días después de su administración, la MDMA produjo una disminución significativa en el contenido de 5-HT y en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT, tanto en el hipocampo como en la corteza frontal, comparado con los animales inyectados con salino (figura 17a-d). La pre-exposición a etanol durante 4 días previos a la administración de la MDMA potenció tanto la pérdida del contenido de 5-HT (figura 17a) como la reducción en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (figura 17c) en el hipocampo. Sin embargo, este efecto no se observó en la corteza frontal (figura 17b-d). Los animales tratados únicamente con etanol no mostraron ningún cambio en el contenido de 5-HT ni en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (figura 17a-d).

Para comprobar que es necesaria una exposición a etanol prolongada para potenciar los efectos de la MDMA, los animales fueron expuestos a vapores de etanol durante un único día (3 h/día), 24 h antes a la administración de la MDMA o del salino. En estas condiciones experimentales, la exposición a vapores de etanol 24 h antes de la administración de la MDMA no potenció ni la pérdida del contenido indólico (figura 18a y b) ni la reducción en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (figura 18c y d) en el hipocampo ni en la corteza frontal, indicando que es necesaria una exposición prolongada a etanol. Etanol administrado de la misma manera 24 h antes que salino, tampoco modificó dichos parámetros serotoninérgicos (figura 18).

Tabla 6. Concentraciones diarias de etanol en plasma en ratas expuestas a etanol bombeado a un flujo de 1 mL/min. Los animales fueron expuestos a vapores de etanol 3 h/día durante 4 días consecutivos.

	<i>Días de exposición a etanol</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Concentración de etanol en plasma (mg/dL)</i>	449 ± 33	409 ± 20	471 ± 39	481 ± 47

Los resultados se muestran como la media ± E.E.M. (n = 6).

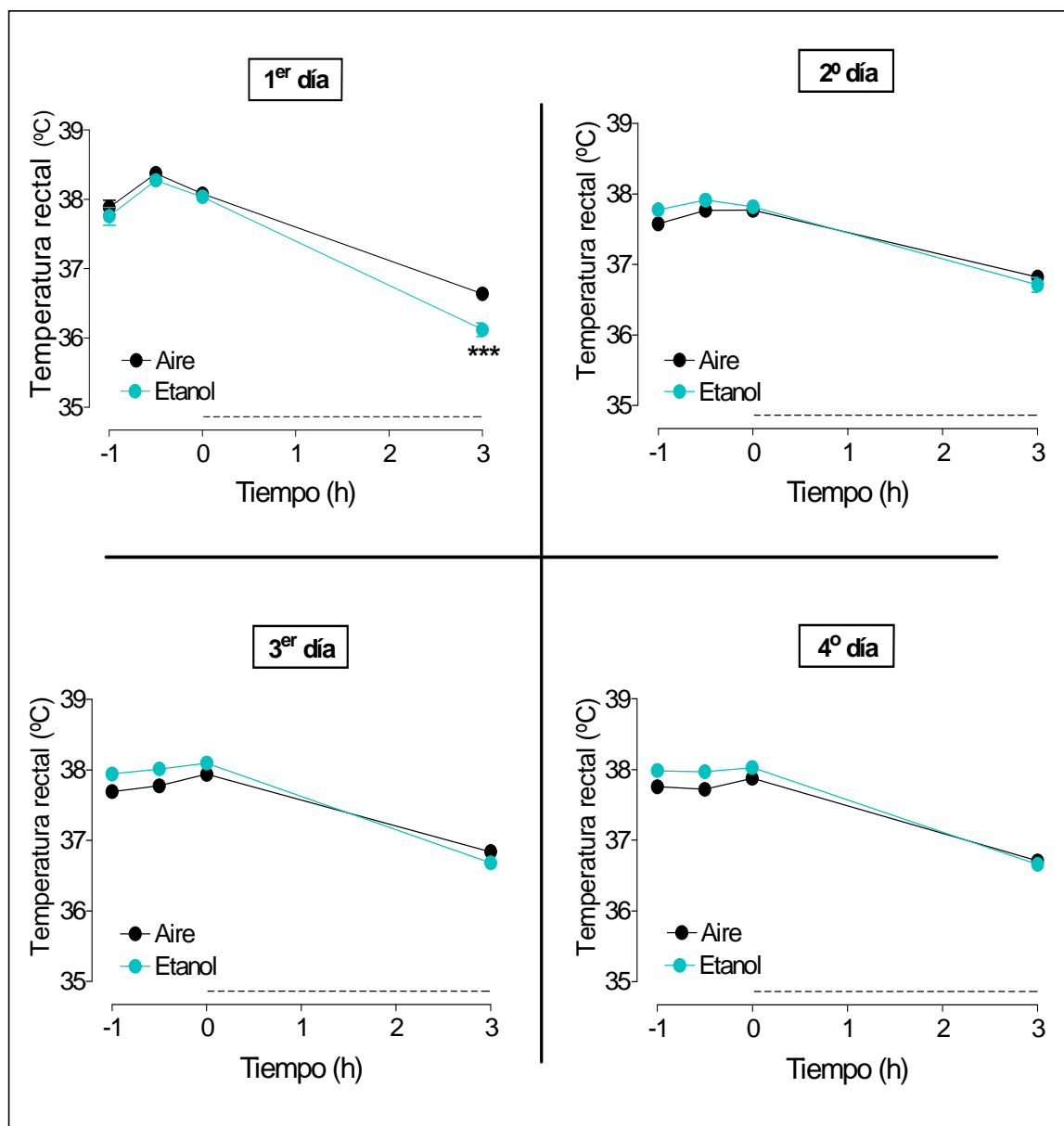


Figura 15. Temperaturas rectales diarias medidas durante 1,5 h antes e inmediatamente después de la exposición a etanol. Las ratas fueron expuestas a etanol 3 h/día durante 4 días consecutivos. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 12-26$ ratas). Diferencias respecto a ratas expuestas a aire humidificado: *** $P < 0,001$.

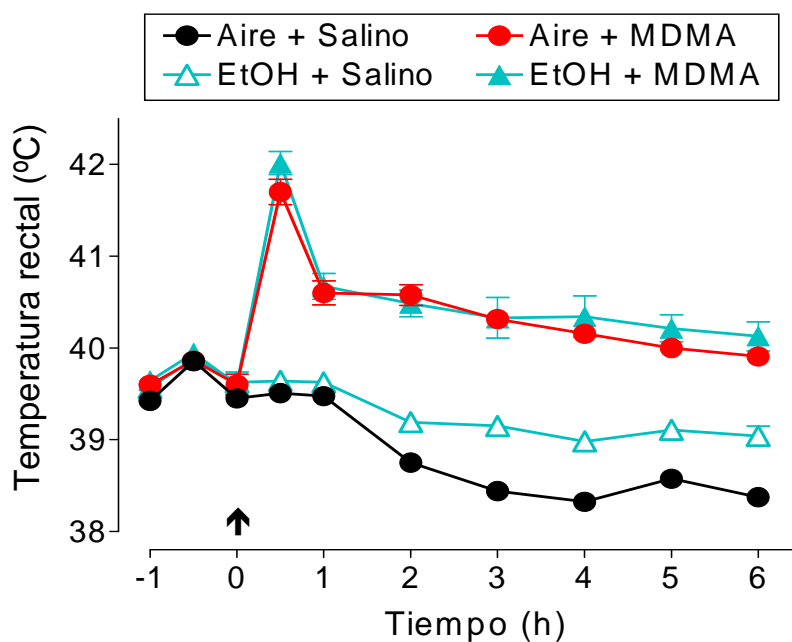


Figura 16. Hipertermia inducida por MDMA (5 mg/kg, i.p.) en ratas pre-expuestas a niveles de etanol (EtOH) en plasma de 450 mg/dL, 3 h/día durante 4 días consecutivos. Veinticuatro horas después de la última exposición a etanol, las ratas fueron colocadas en una habitación a una temperatura ambiente de 30 °C durante 2,5 h antes y hasta 6 h después de la inyección de la MDMA. La temperatura fue medida desde 1,5 h antes y hasta 6 h después de la inyección de la MDMA. La flecha muestra el tiempo de la administración de la MDMA. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 7-13$ ratas). La MDMA produjo un aumento significativo en la temperatura rectal de los animales [$F(1,23) = 313,2$, $P < 0.001$] en comparación con los animales inyectados con salino. El pre-tratamiento con etanol no modificó la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA [$F(1,18) = 0,70$, $P = 0.41$], aunque incrementó la temperatura rectal de ratas inyectadas con salino [$F(1,22) = 13,59$, $P < 0.01$].

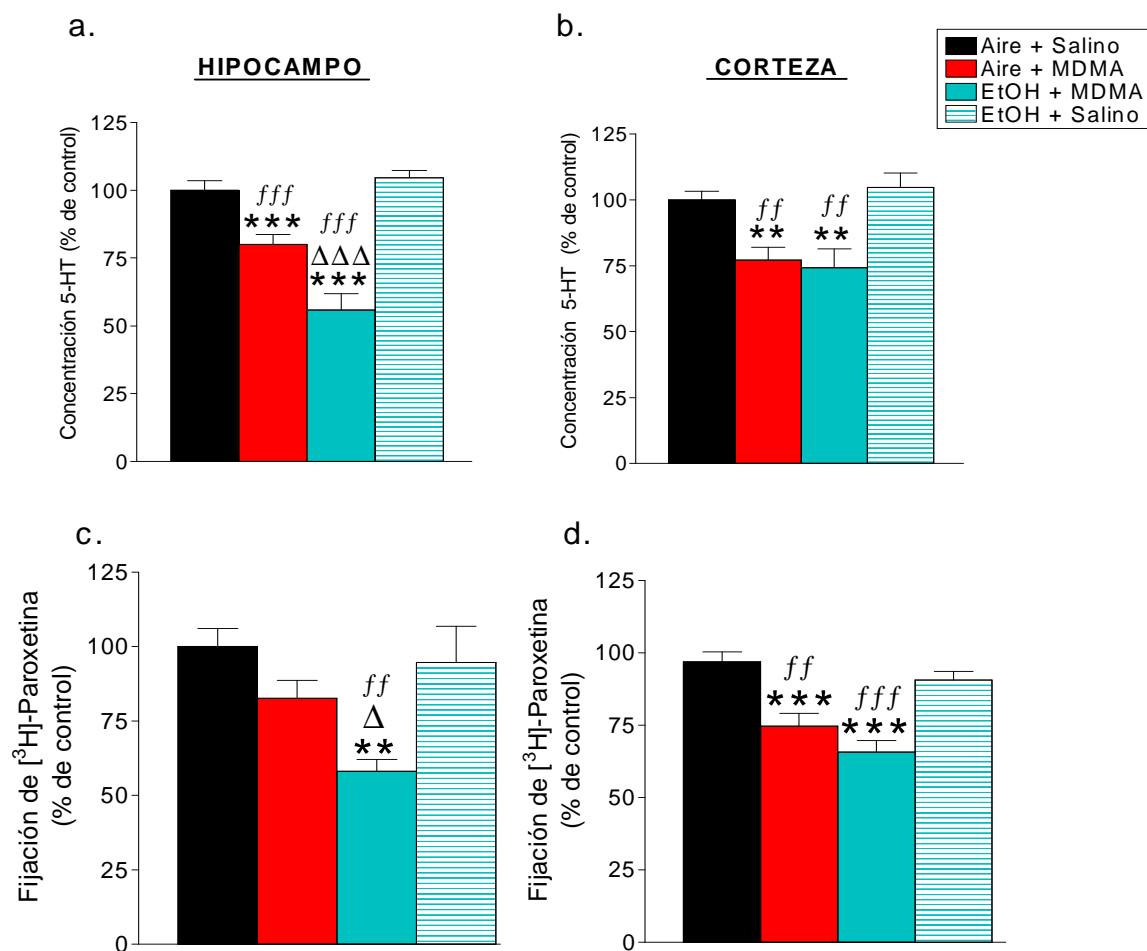


Figura 17. Cambios inducidos por MDMA (5 mg/kg, i.p.) en el contenido de 5-HT (a y b) y en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT (c y d) en hipocampo y corteza frontal de ratas pre-expuestas a etanol. Los animales fueron expuestos a etanol, 3 h/día durante 4 días consecutivos. Veinticuatro horas después de la última exposición a etanol, las ratas fueron colocadas en una habitación a una temperatura ambiente de 30 °C durante 2,5 h antes y hasta 6 h después de la administración de la MDMA. Siete días después se sacrificaron. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 6-12$ ratas). Diferencias respecto a ratas inyectadas con salino pre-expuestas a aire humidificado: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Diferencias respecto a ratas inyectadas con MDMA pre-expuestas a aire humidificado: $\Delta P < 0,05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0,001$. Diferencias respecto a ratas inyectadas con salino pre-expuestas a etanol: $ff P < 0,01$, $fff P < 0,001$. Los valores absolutos de concentración de 5-HT y fijación de [³H]-paroxetina en el hipocampo fueron 540 ± 20 ng/g tejido y 232 ± 14 fmol/mg proteína, respectivamente, y en la corteza fueron 170 ± 5 ng/g tejido y 89 ± 6 fmol/mg proteína, respectivamente.

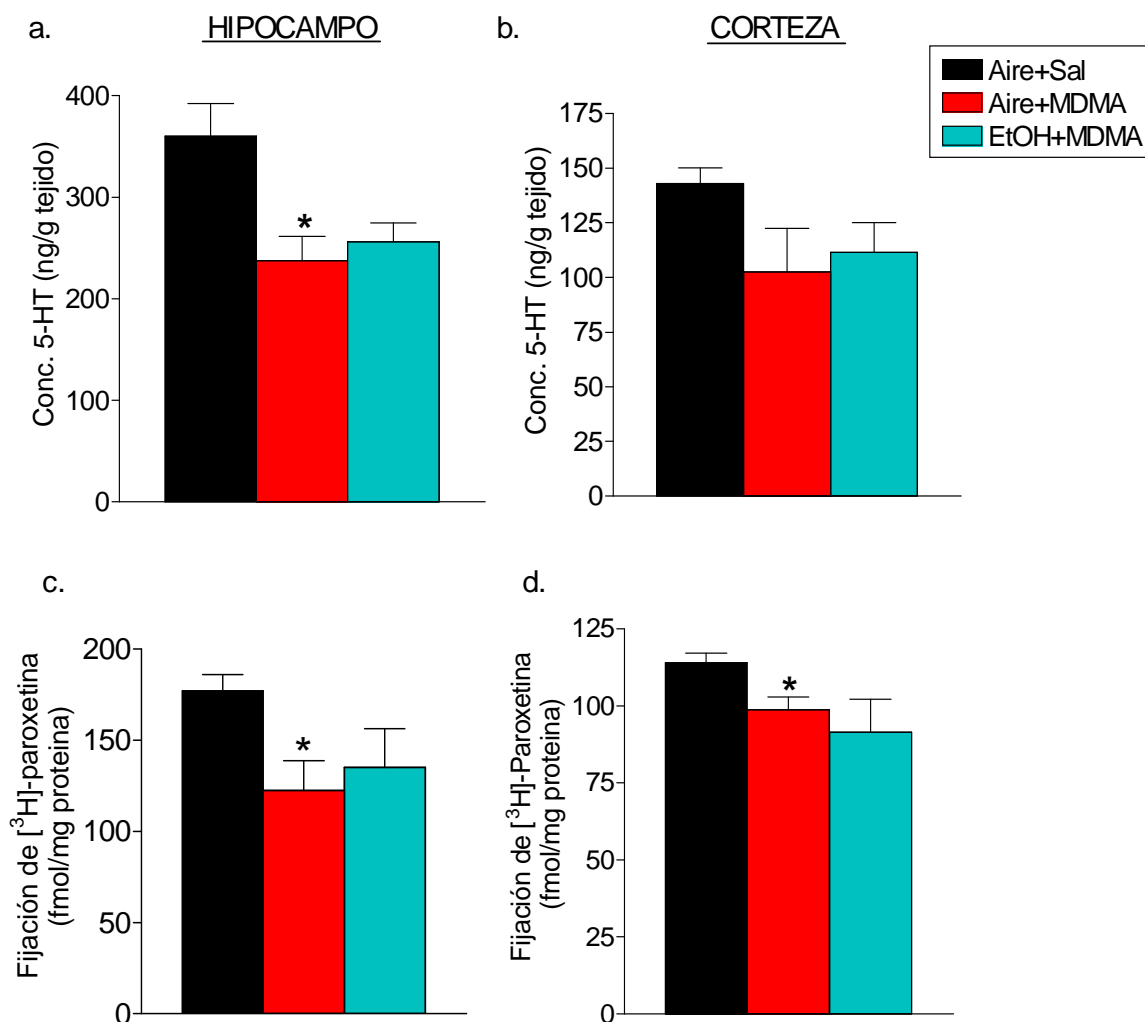


Figura 18. Cambios inducidos por MDMA (5 mg/kg, i.p.) en el contenido de 5-HT (a y b) y en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT (c y d) en hipocampo y corteza frontal de ratas pre-expuestas a etanol 24 h antes. Los animales fueron expuestos a etanol 3 h/día. Veinticuatro horas después de la exposición a etanol, las ratas fueron colocadas en una habitación a una temperatura ambiente de 30 °C durante 2,5 h antes y hasta 6 h después de la administración de la MDMA. Siete días después se sacrificaron. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n = 6-12 ratas). Diferencias respecto a ratas inyectadas con salino: *P<0,05.

1.3. Implicación de los radicales libres en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

La inyección de una dosis de MDMA de 5 mg/kg, i.p. a una temperatura ambiente de 30 °C produjo un aumento significativo en la concentración del ácido 2,3-DHBA en el dializado hipocampal (figura 19). El aumento en los niveles de 2,3-DHBA fue aproximadamente del 20-25 % sobre la concentración observada en ratas inyectadas con salino. La pre-exposición a etanol potenció significativamente el efecto inducido por MDMA sobre los niveles de 2,3-DHBA en el dializado hipocampal (figura 19); sin embargo, no modificó el contenido de 2,3-DHBA en ratas tratadas con salino (figura 19).

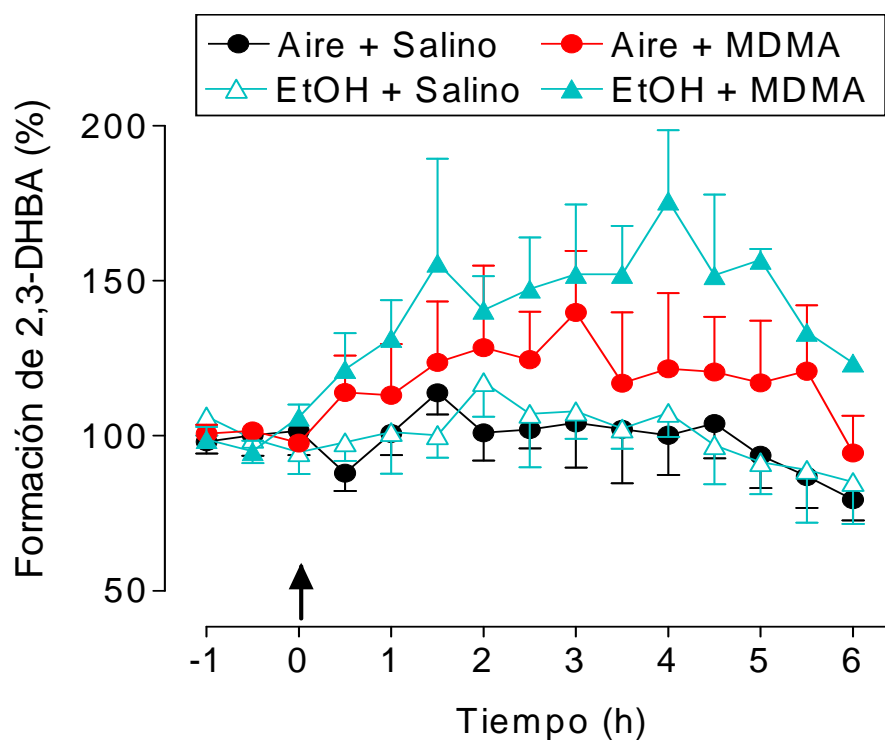


Figura 19. Cambios en los niveles del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) en el dializado hipocampal de ratas expuestas a etanol o aire humidificado 3 h/día durante 4 días consecutivos e inyectadas con MDMA (5 mg/kg, i.p.) o salino. La flecha muestra el momento de la administración de la MDMA. La MDMA produjo un aumento significativo en los niveles extracelulares de 2,3-DHBA [$F(1,11) = 3,32$, $P < 0,05$]. Este efecto fue potenciado por la pre-exposición a etanol [$F(1,14) = 3,42$, $P < 0,05$]. Los valores son expresados como porcentaje de la media de las tres medidas anteriores a la administración de la MDMA. Cada valor es la media \pm E.E.M. de 5 a 9 experimentos. La concentración basal de 2,3-DHBA en ratas inyectadas con salino ($n = 6$) fue $8,69 \pm 1,3$ pg/ μ L.

1.4. Implicación del acetaldehído en el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

Ratas expuestas a niveles de etanol en plasma de 450 mg/dL mostraron niveles de acetaldehído en plasma que oscilaron entre 0,22 y 0,30 mg/dL inmediatamente después de las 3 h de exposición a etanol, cada uno de los 4 días de tratamiento (figura 20). La administración de cianamida (50 mg/kg, i.p.) los días 1 y 3 del periodo de exposición a etanol, incrementó marcadamente la concentración de acetaldehído en plasma (400 % el primer día y 600 % el tercer día) en comparación con los animales que recibieron sólo etanol (figura 20). No obstante, no se observaron cambios en los niveles plasmáticos de acetaldehído en los días 2 y 4 de exposición a etanol (figura 20). Por otro lado, la cianamida no alteró los niveles de etanol en plasma en ninguno de los 4 días de exposición a etanol (figura 20).

La cianamida potenció significativamente la hipotermia inducida por etanol, de manera que los animales inyectados con cianamida mostraron una temperatura rectal de entre 3-3,5 °C por debajo de la observada en animales tratados sólo con etanol (figura 21).

Veinticuatro horas después de la exposición a etanol, los animales tratados con etanol más cianamida mostraron una respuesta hipertérmica a la MDMA que fue menos pronunciada que la inducida por MDMA en ratas tratadas con etanol pero no inyectadas con cianamida (figura 22). Siete días después de la administración de la MDMA, ratas expuestas a etanol e inyectadas con cianamida mostraron una reducción en la concentración cortical de 5-HT (figura 23) y una reducción en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en hipocampo y corteza (figura 23); esta reducción fue mayor que la observada en animales expuestos únicamente a etanol. Finalmente, ratas expuestas a etanol e inyectadas con cianamida, pero no tratadas con MDMA, no mostraron ningún cambio en la concentración de 5-HT ni en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (figura 23).

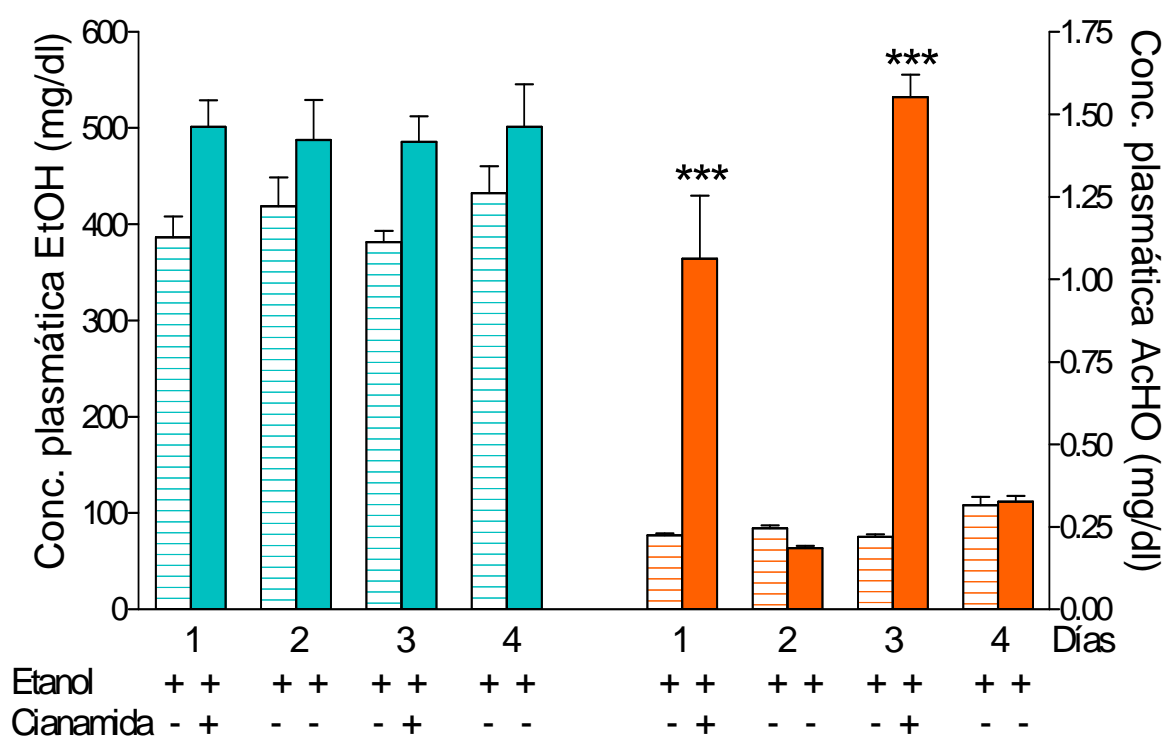


Figura 20. Concentraciones plasmáticas de etanol (EtOH) y acetaldehído (AcHO) en ratas expuestas a concentraciones de etanol en plasma de 450 mg/dL e inyectadas con cianamida (50 mg/kg, i.p.). Los animales fueron expuestos a etanol 3 h/día durante 4 días consecutivos. La cianamida fue administrada los días 1 y 3 de exposición a etanol. Las muestras de sangre se tomaron diariamente inmediatamente después de las 3 h de exposición a etanol. Las ratas expuestas a etanol mostraron niveles de acetaldehído en plasma de 0,22 - 0,30 mg/dL los 4 días de exposición a etanol. La administración de cianamida aumentó marcadamente la concentración de acetaldehído en plasma los días 1 y 3 de tratamiento. No se observaron cambios en los niveles de acetaldehído los días 2 y 4 de exposición a etanol. La cianamida no alteró los niveles de etanol en plasma ninguno de los cuatro días de exposición. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n = 9-13). Diferencias respecto a ratones expuestos únicamente a etanol: *** $P < 0,001$.

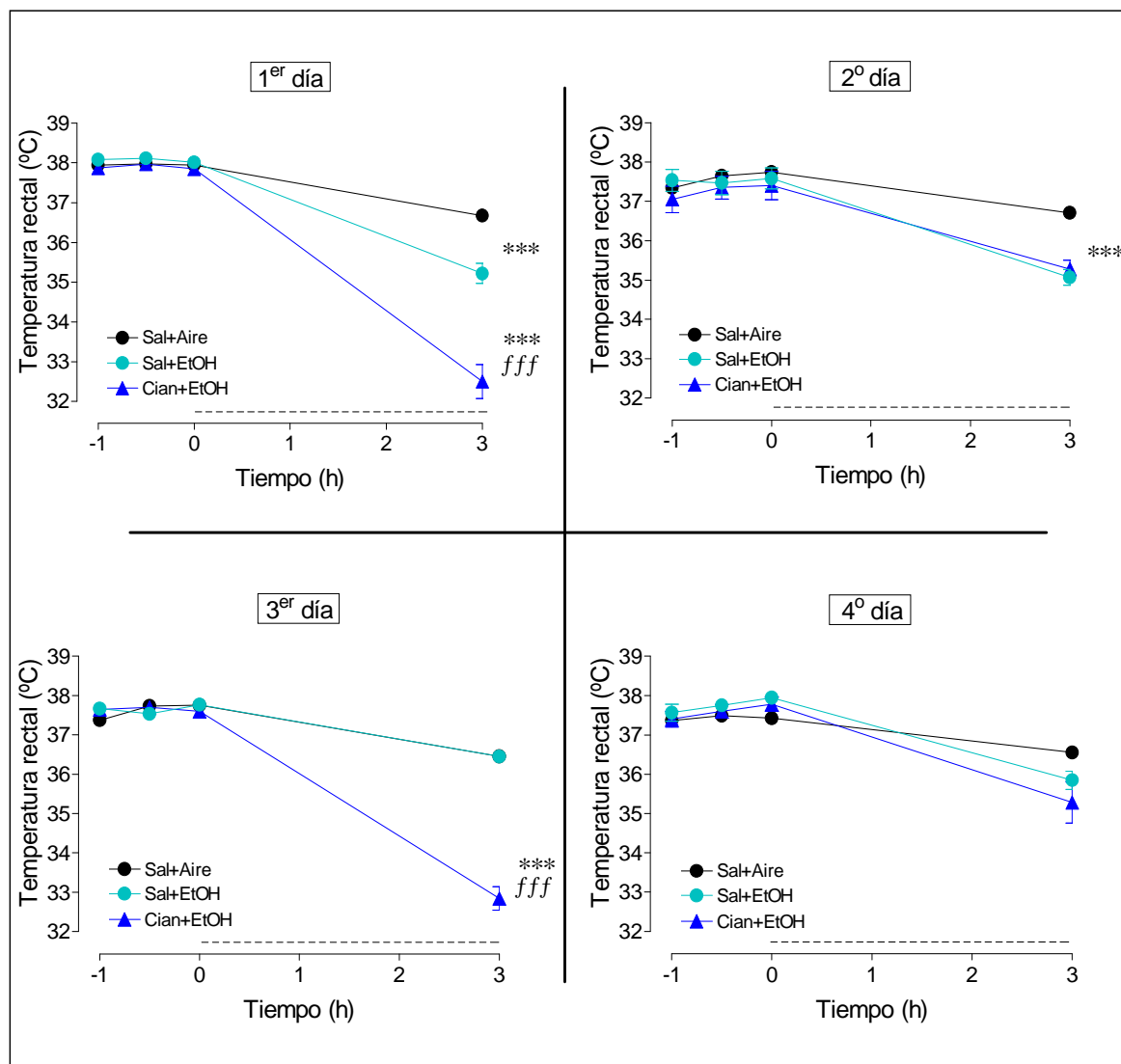


Figura 21. Temperaturas rectales diarias de ratas expuestas a concentraciones de etanol en plasma de 450 mg/dL e inyectadas con cianamida. Los animales fueron expuestos a etanol 3 h/día durante 4 días consecutivos. La cianamida fue administrada los días 1 y 3 de exposición a etanol. Las temperaturas rectales se midieron durante 1,5 h antes de la exposición a etanol e inmediatamente después de sacar las ratas de la cámara de inhalación. Los resultados son mostrados como la media \pm E.E.M. ($n = 5-13$ ratas). Diferencias respecto a ratas expuestas a aire humidificado: *** $P < 0,001$; diferencias respecto a ratas expuestas únicamente a etanol: fff $P < 0,001$.

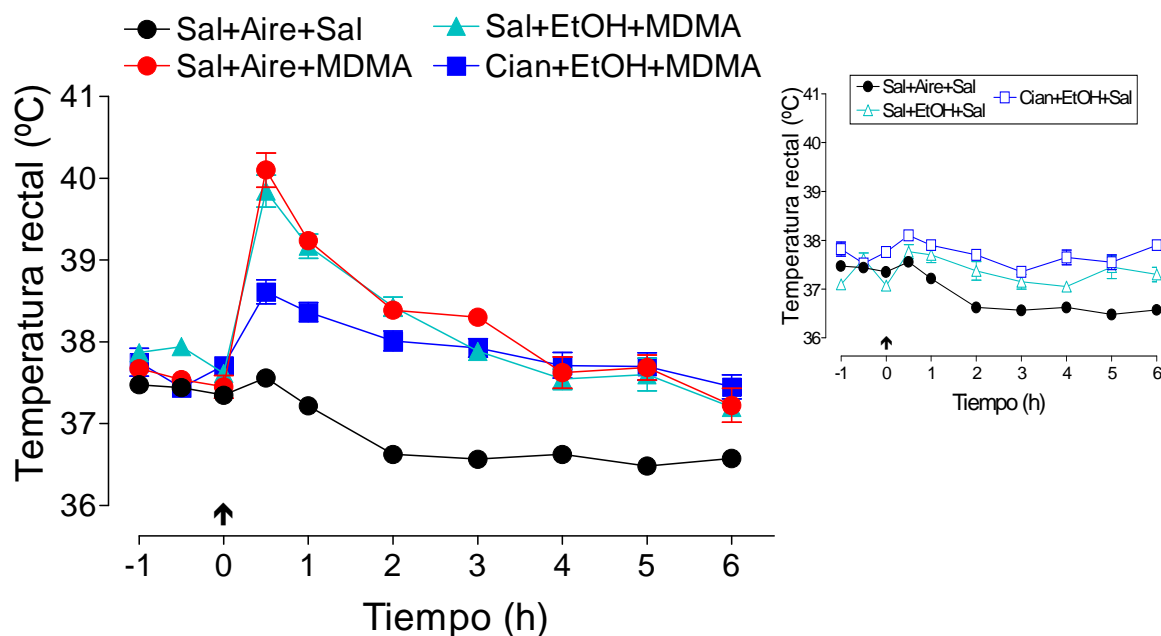


Figura 22. Hipertermia inducida por MDMA (5 mg/kg, i.p.) en ratas pre-expuestas a etanol (EtOH) 3 h/día durante 4 días consecutivos e inyectadas con cianamida (Cian) (50 mg/kg, i.p.) los días 1 y 3 de exposición a etanol. Veinticuatro horas después de la última exposición a etanol, las ratas fueron colocadas a una temperatura ambiente de 30 °C, durante 2,5 h antes y hasta 6 h después de la inyección de la MDMA, y se midió la temperatura rectal de los animales desde 1,5 h antes hasta 6 h después de la administración de la MDMA. La flecha muestra el momento de la inyección de la MDMA. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 7-12$ ratas). La MDMA produjo un aumento significativo en la temperatura rectal de los animales [$F(1,18) = 268,5$, $P < 0,001$] comparado con el grupo inyectado con salino. Este efecto no fue modificado por la pre-exposición a etanol [$F(1,13) = 0,84$, $P = 0,84$, n.s.]. Sin embargo, ratas inyectadas con cianamida los días 1 y 3 de la exposición a etanol mostraron una respuesta hipertérmica menos pronunciada que los animales tratados únicamente con etanol [$F(1,13) = 4,52$, $P < 0,05$]. La gráfica pequeña muestra la temperatura rectal de ratas pre-tratadas con etanol y cianamida e inyectadas con salino en lugar de MDMA. Así, ratas pre-expuestas a etanol mostraron un aumento en la temperatura rectal comparadas con aquellas expuestas a aire [$F(1,10) = 21,92$, $P < 0,001$]. La cianamida no modificó los cambios en la temperatura rectal inducidos por etanol [$F(1,4) = 2,95$, $P < 0,16$, n.s.]. La flecha muestra el momento de la administración del salino.

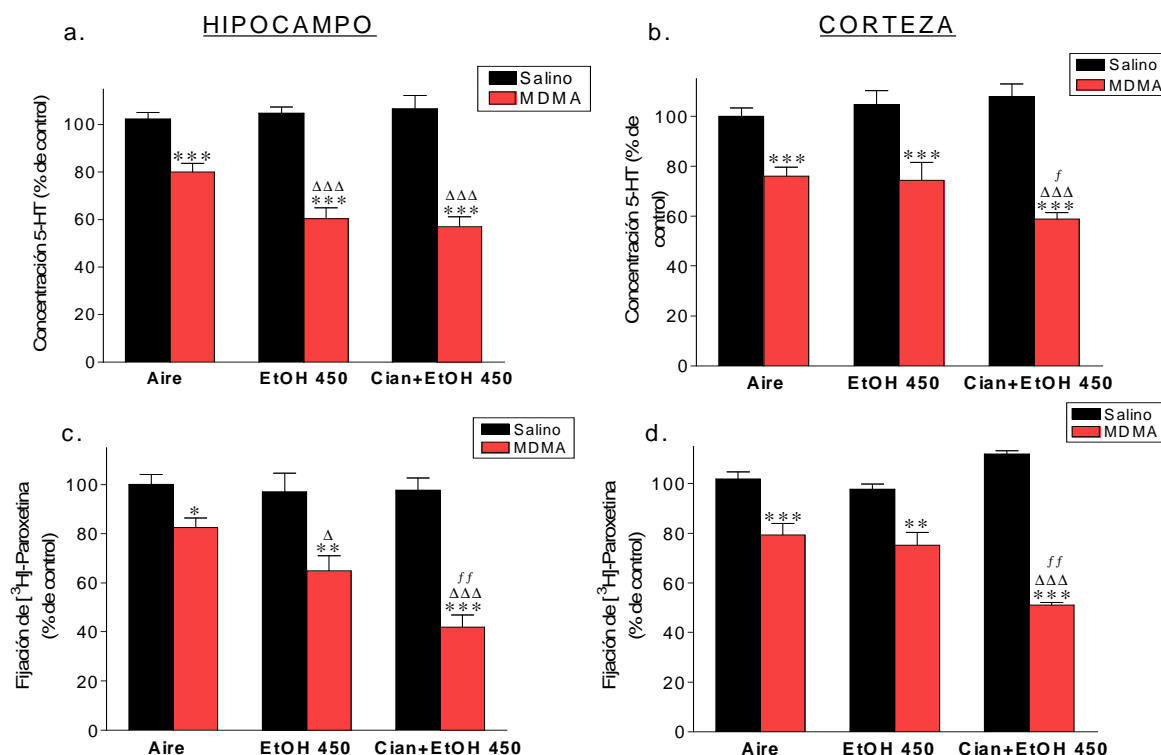


Figura 23. Cambios inducidos por MDMA (5 mg/kg, i.p.) sobre la concentración de 5-HT (a, b) y sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (c, d) en el hipocampo y corteza frontal de ratas pre-expuestas a etanol (EtOH) e inyectadas con cianamida (Cian). Los animales fueron expuestos a etanol 3 h/día durante 4 días consecutivos, siendo inyectados un grupo de ellos con cianamida (50 mg/kg, i.p.) los días 1 y 3 del tratamiento. El día 5, todas las ratas fueron colocadas en una habitación a temperatura ambiente de 30 °C durante 2,5 h y hasta 6 h después de la administración de la MDMA y 7 días después, fueron sacrificadas. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n = 6-12 ratas). Diferencias respecto a ratas inyectadas con salino: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Diferencias respecto a ratas inyectadas con MDMA pre-expuestas a aire humidificado: $\Delta P < 0,05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0,001$. Diferencias respecto a ratas inyectadas con MDMA pre-expuestas a etanol: $f P < 0,05$, $ff P < 0,01$. Los valores absolutos de concentración de 5-HT y fijación de [3H]-paroxetina en el hipocampo fueron 432 ± 32 ng/g tejido y 171 ± 23 fmol/mg proteína, respectivamente, y en la corteza fueron 176 ± 6 ng/g tejido y 138 ± 15 fmol/mg proteína, respectivamente. Los niveles basales de contenido de 5-HT y transportadores de 5-HT fueron semejantes en los tres grupos de tratamiento para cada estructura.

Estudio 2: Efecto producido por la lesión dopaminérgica inducida por MDMA en el cerebro del ratón sobre el consumo y la preferencia por etanol.

2.1. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre el consumo y la preferencia por etanol.

Los ratones inyectados con MDMA o salino (control) no mostraron preferencia por el lugar de colocación de las pipetas ni diferencia en el volumen de fluido consumido de cada una de las dos pipetas cuando tuvieron acceso continuo *ad libitum* a dos pipetas conteniendo agua corriente durante 4 semanas (figura 24). Además, el volumen total de agua consumido diariamente por los ratones lesionados con MDMA ($4,4 \pm 0,15$ mL/día, $n=9$) fue similar al ingerido por los animales control inyectados con salino ($4,3 \pm 0,13$ mL/día, $n=9$). Estos tests de preferencia aseguran que la preferencia por alcohol en ratones controles y en ratones inyectados con MDMA no está influenciada por la preferencia de lugar y además, nos permiten afirmar que la pre-exposición a MDMA no produce un incremento en la ingesta de líquido.

La figura 25 muestra el consumo y la preferencia por etanol, así como el consumo relativo de fluido de animales pre-tratados con MDMA y salino según el procedimiento de libre elección de dos botellas, con concentraciones crecientes de etanol. Como se puede observar, los animales lesionados con MDMA 7 días antes mostraron un incremento en el consumo de las soluciones de etanol (figura 25a) así como una mayor preferencia por etanol (figura 25b) en comparación con los animales control. Ambos grupos de ratones, pre-tratados con MDMA y con salino, mostraron un incremento en la preferencia por etanol directamente proporcional a la concentración de etanol en el agua de bebida hasta la concentración del 10 %. Para la solución del 20 %, los ratones mostraron una menor preferencia, lo cual es consistente con un componente aversivo al sabor de las concentraciones elevadas de etanol. El consumo total ($\text{mL}_{\text{etanol+agua}}$) y relativo ($\text{mL}_{\text{etanol+agua}}/\text{kg}$, figura 25c) de fluido fue similar en ambos grupos, indicando que el aumento en el consumo de etanol que se observa en los ratones pre-tratados con MDMA no fue debido a un aumento en la cantidad total de líquido consumido.

No se observaron diferencias significativas en la temperatura rectal entre los animales control y los animales inyectados con MDMA a lo largo de todo el experimento (figura 26). Por otro lado, la ingesta de alimento también fue similar entre ambos grupos de animales durante todo el experimento (figura 27a), sin observarse una pérdida o ganancia de peso corporal significativa durante la exposición a etanol (figura 27b).

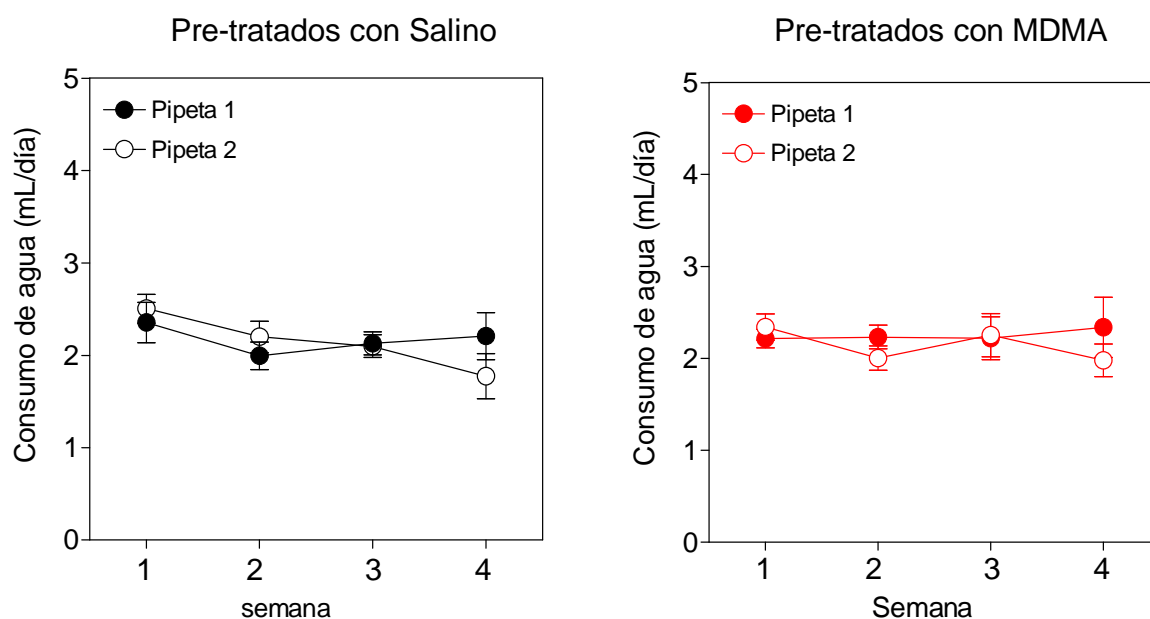


Figura 24: Volumen de fluido consumido de cada una de las dos pipetas por ratones pre-tratados 7 días antes con MDMA o salino, cuando tuvieron acceso continuo *ad libitum* a dos pipetas conteniendo agua corriente durante 4 semanas. Se determinaron los mL de agua consumidos por día por cada ratón todos los días y se determinó la media del consumo de agua por día para cada semana. No se observaron diferencias significativas en el consumo de ambas pipetas en ninguno de los dos grupos (Pre-tratados con salino: $F(1,16)=0,01$, $P=0,9133$, n.s.; Pre-tratados con MDMA: $F(1,18)=0,63$, $P=0,439$, n.s.). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 8-10$ ratones).

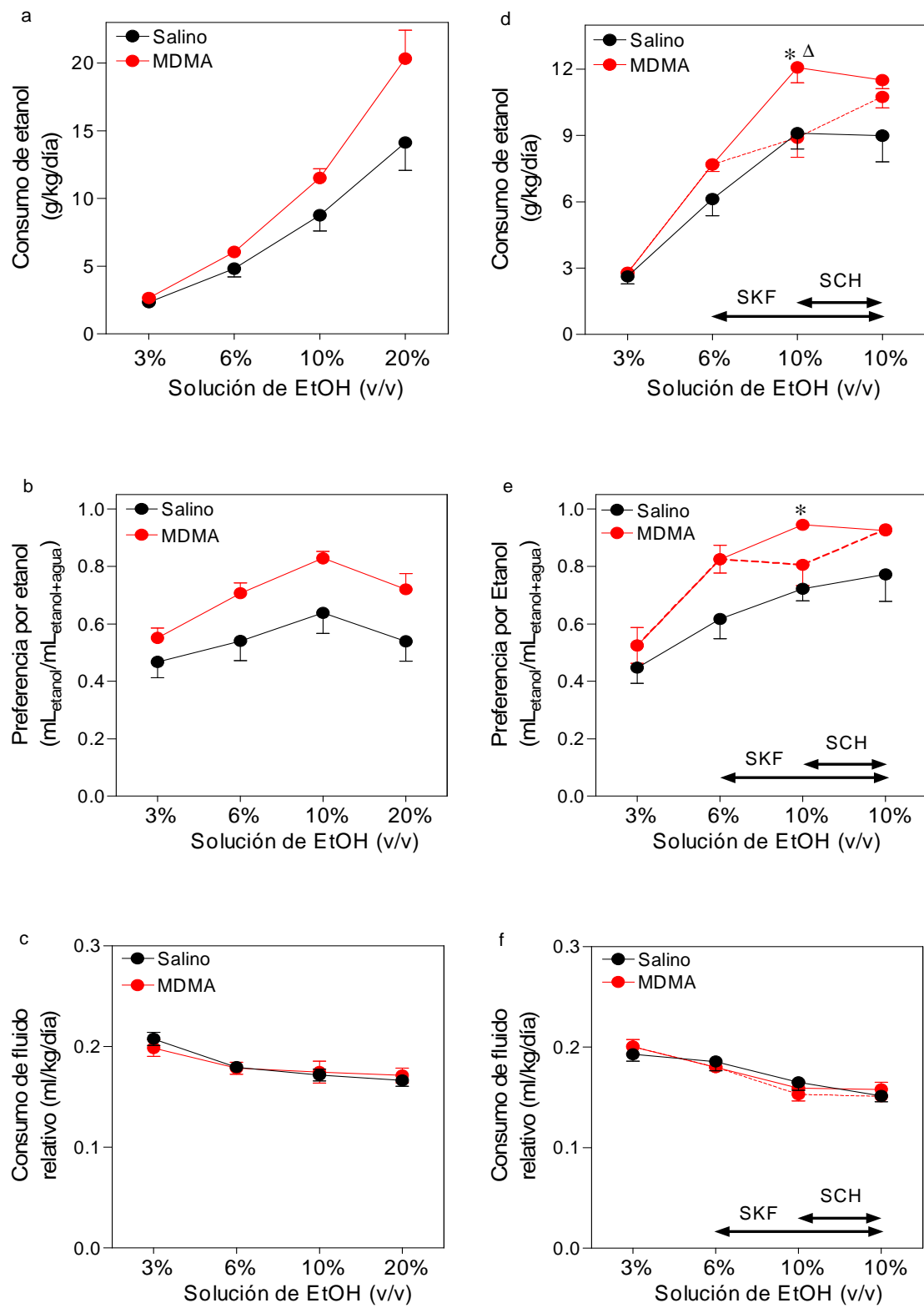


Figura 25: Consumo (a) y preferencia (b) por etanol y consumo relativo de fluido total (c) en ratones expuestos a MDMA (30 mg/kg, 3 veces cada 3 h, i.p.) o salino 7 días antes del comienzo del paradigma de libre elección de 2 botellas. Los ratones tuvieron 7 días de acceso a cada solución de etanol (3, 6, 10 y 12 % de etanol). a) Consumo (g/kg/día) de cada solución de etanol (media de 7 días). Hubo un efecto significativo del pre-tratamiento [$F(1,19)=3,48$, $P<0,05$] y de la concentración de etanol [$F(3,57)=76,16$, $P<0,001$], pero no hubo un efecto significativo de interacción entre ambas variables [$F(3,57)=2,73$, n.s.]. b) Preferencia (volumen de etanol / volumen total de fluido consumido). Hubo un efecto significativo del pre-tratamiento [$F(1,19)=6,45$, $P<0,01$] y de la concentración de etanol [$F(3,57)=15,40$, $P<0,001$], pero no hubo un efecto significativo de interacción entre ambas variables [$F(3,57)=0,85$, n.s.]. c) Consumo relativo de fluido (mL/kg/día) a cada concentración de etanol (media de 7 días). Los gráficos de la derecha muestran el consumo (d) y la preferencia (e) por etanol y el consumo relativo de fluido total (f) en ratones pre-tratados con MDMA y salino, como se describe arriba, pero expuestos a la solución de etanol del 10 % durante 14 días (línea punteada), recibiendo los siete primeros días el agonista D_1 SKF81297 (1 mg/kg, i.p., todos los días) y los 7 días siguientes el agonista anterior junto con el antagonista D_1 SCH23380 (100 μ g/kg, i.p., todos los días). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n=10-11 ratones). Diferencias respecto a ratones pre-tratados con salino: * $P<0,05$. Diferencias respecto al grupo pre-tratado con MDMA e inyectado con SKF81297: $^{\Delta}P<0.05$.

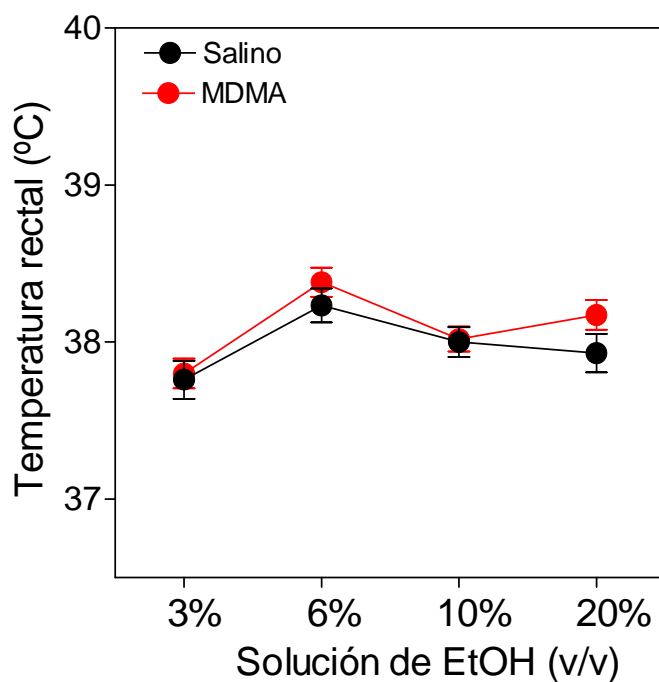


Figura 26: Temperatura rectal durante la exposición a concentraciones crecientes de etanol de ratones pre-tratados con MDMA o salino 7 días antes de comenzar el paradigma de libre elección de dos botellas. Se midió la temperatura rectal de los animales los días 4 y 7 de cada intervalo de 7 días y se calculó la media de dicha temperatura rectal para cada concentración de etanol. No hubo diferencias significativas en la temperatura rectal entre ambos grupos experimentales a lo largo de todo el experimento [$F(1,19)=2,59$, $P=0,124$]. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 10-11$ ratones).

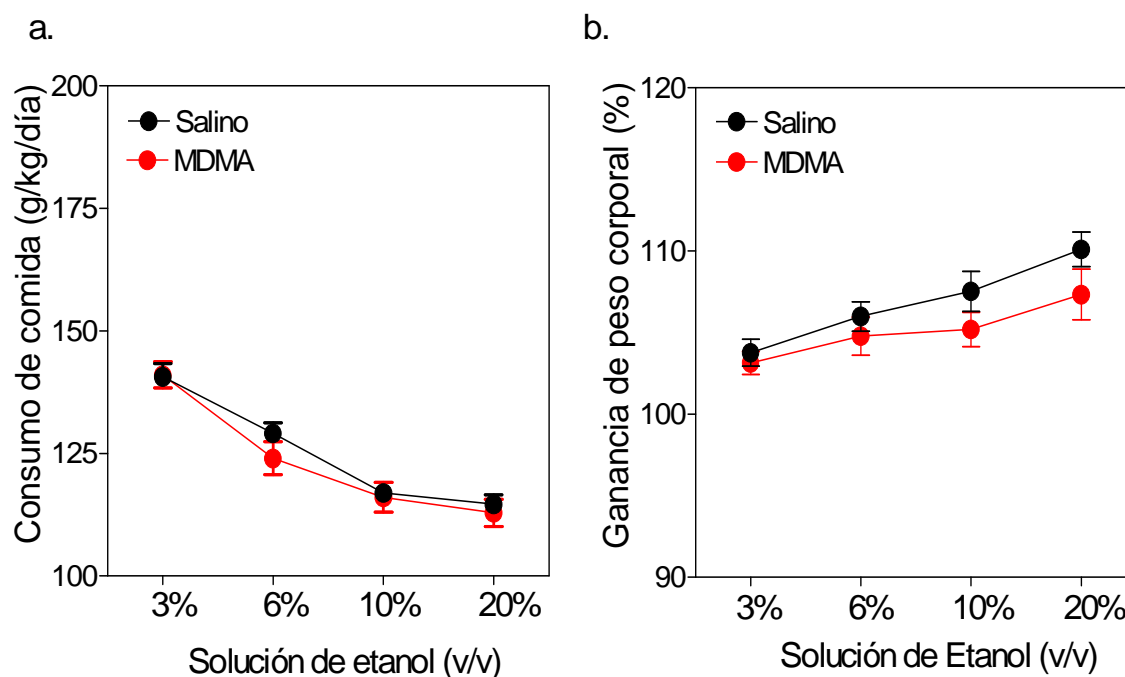


Figura 27: Ingesta de comida (a) y ganancia de peso corporal (b) durante la exposición a concentraciones crecientes de etanol de ratones pre-tratados con MDMA o salino 7 días antes de comenzar el modelo de libre elección de dos botellas. Se determinó la ingesta de comida y la ganancia de peso de los animales los días 4 y 7 de cada intervalo de 7 días y se calculó la media de dichos parámetros para cada concentración de etanol. No hubo diferencias significativas en el consumo de comida [$F(1,19)=0,33$, $P=0,543$] ni en la ganancia de peso corporal [$F(1,17)=1,56$, $P=0,229$] a lo largo de todo el experimento. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M (n = 9-11 ratones).

2.2. Efecto de agonistas y antagonistas D_1 sobre el consumo y la preferencia por etanol en ratones pre-expuestos a una dosis neurotóxica de MDMA.

La administración de SKF81297 (1 mg/kg) a los ratones pre-tratados con MDMA cada uno de los 7 días que tuvieron acceso a etanol 10 % redujo significativamente el consumo de etanol (figura 25d) y ligeramente (no significativamente) la preferencia (figura 25e). SKF81297 no modificó la ingesta relativa de líquido (figura 25f). SCH23390 (100 μ g/kg) revirtió el efecto producido por el agonista D_1 SKF81297 (figura 25d y e). SKF81297 y SCH23390 no modificaron el consumo y preferencia por etanol en ratones no lesionados con MDMA (tabla 7).

Tabla 7: Consumo (g/kg/día) y preferencia ($\text{volumen}_{\text{etanol}}/\text{volumen}_{\text{total de fluido consumido}}$) por etanol en ratones no lesionados con MDMA 7 días antes del comienzo del paradigma de libre elección de 2 botellas. Los ratones tuvieron 7 días de acceso a la solución de 3 y 6% de etanol y fueron expuestos a la solución de etanol del 10 % durante 14 días, recibiendo los siete primeros días el agonista D_1 SKF81297 (1 mg/kg, i.p., todos los días) y los 7 días siguientes el agonista anterior junto con el antagonista D_1 SCH23380 (100 $\mu\text{g/kg}$, i.p., todos los días). No hubo diferencias significativas entre ambos grupos de animales. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n=10-11 ratones).

Solución de etanol (v/v)	CONSUMO DE ETANOL (g/kg/día)		PREFERENCIA POR ETANOL ($\text{mL}_{\text{etanol}}/\text{mL}_{\text{etanol+agua}}$)	
	<i>Sal+sal+sal</i>	<i>Sal+SKF+SCH</i>	<i>Sal+sal+sal</i>	<i>Sal+SKF+SCH</i>
3 %	1,508 \pm 0,062	1,508 \pm 0,062	0,477 \pm 0,062	0,477 \pm 0,062
6 %	2,546 \pm 0,524	2,546 \pm 0,524	0,550 \pm 0,086	0,550 \pm 0,086
10 %	4,329 \pm 1,242	5,166 \pm 1,164	0,743 \pm 0,143	0,696 \pm 0,083
10 %	5,121 \pm 1,226	5,674 \pm 1,359	0,751 \pm 0,144	0,766 \pm 0,06

2.3. Efecto de la MDMA sobre la liberación de dopamina inducida por etanol en el núcleo accumbens.

Los niveles extracelulares basales de DA en el núcleo accumbens de ratones pre-tratados con MDMA fueron más bajos que aquellos observados en el grupo control (figura 28). Para comparar las dos curvas independientemente de la diferencia en sus valores basales, los valores post-tratamiento fueron expresados como porcentaje con respecto a los valores basales (figura 28 insertada). La administración de etanol incrementó significativamente los niveles de DA en el dializado de ratones pre-tratados con salino mientras que no tuvo efecto en ratones pre-tratados con MDMA (figura 28 insertada).

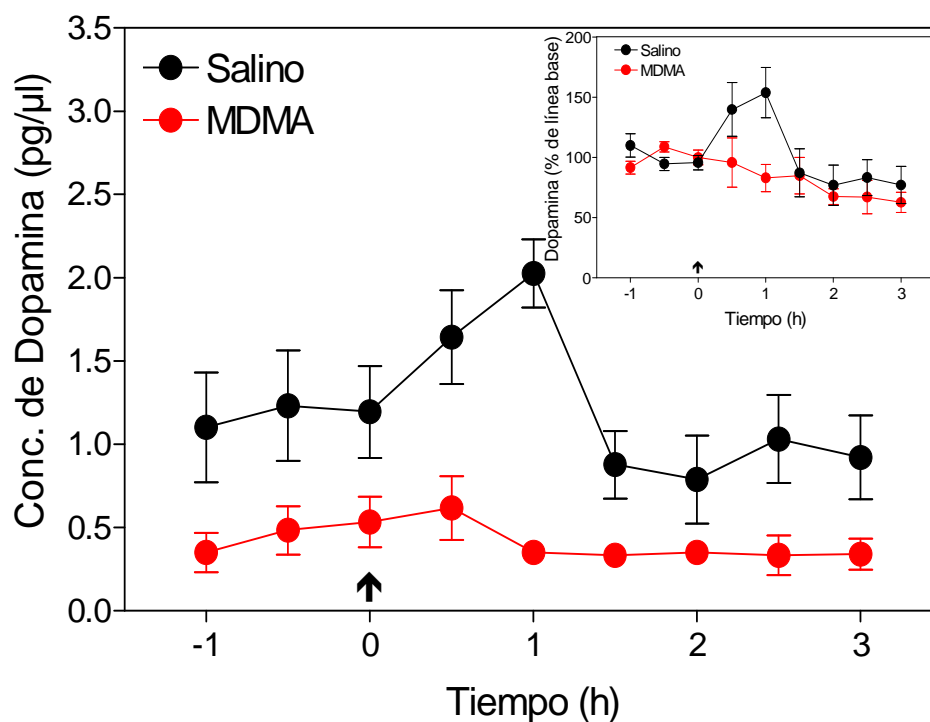


Figura 28: Efecto del etanol (EtOH, 3 g/kg) sobre los niveles extracelulares de DA en el núcleo accumbens de ratones que recibieron MDMA o salino 7 días antes. Los valores basales de dopamina extracelular, expresados como la media de las 3 medidas antes de la administración del etanol, fueron mayores ($P < 0,001$) en ratones pre-tratados con salino ($1,18 \pm 0,04$ pg/μl, $n = 3$) que en ratones pre-tratados con MDMA ($0,45 \pm 0,05$ pg/μl, $n=3$). Para comparar las dos curvas independientemente de la diferencia en sus valores basales, los valores post-tratamiento fueron expresados como porcentaje con respecto a valores basales (figura insertada). El etanol produjo un incremento en los niveles de DA en el dializado de ratones control pero no en ratones pre-tratados con MDMA [$F(1,10)=3,57$, $P < 0,05$]. Cada valor es la media \pm E.E.M. de 5-7 animales.

2.4. Efecto de la MDMA sobre la densidad de los receptores de dopamina D_1 y D_2 en el núcleo accumbens y caudado-putamen.

La unión de [3 H]-SCH23390 a receptores de DA D_1 aumentó significativamente en el caudado putamen y en el núcleo del núcleo accumbens 7 días después de la administración de la MDMA en comparación con la fijación observada en ratones inyectados con salino (figura 29). Hubo también una tendencia a aumentar la densidad de este receptor de DA D_1 en la corteza del núcleo accumbens, si bien no fue estadísticamente significativa. Los valores retornaron a niveles basales 4 semanas después del tratamiento.

No se observaron cambios en la unión de [3 H]-YM09151 en ninguna de las áreas cerebrales examinadas 1 ó 4 semanas después de la inyección de la MDMA (figura 29).

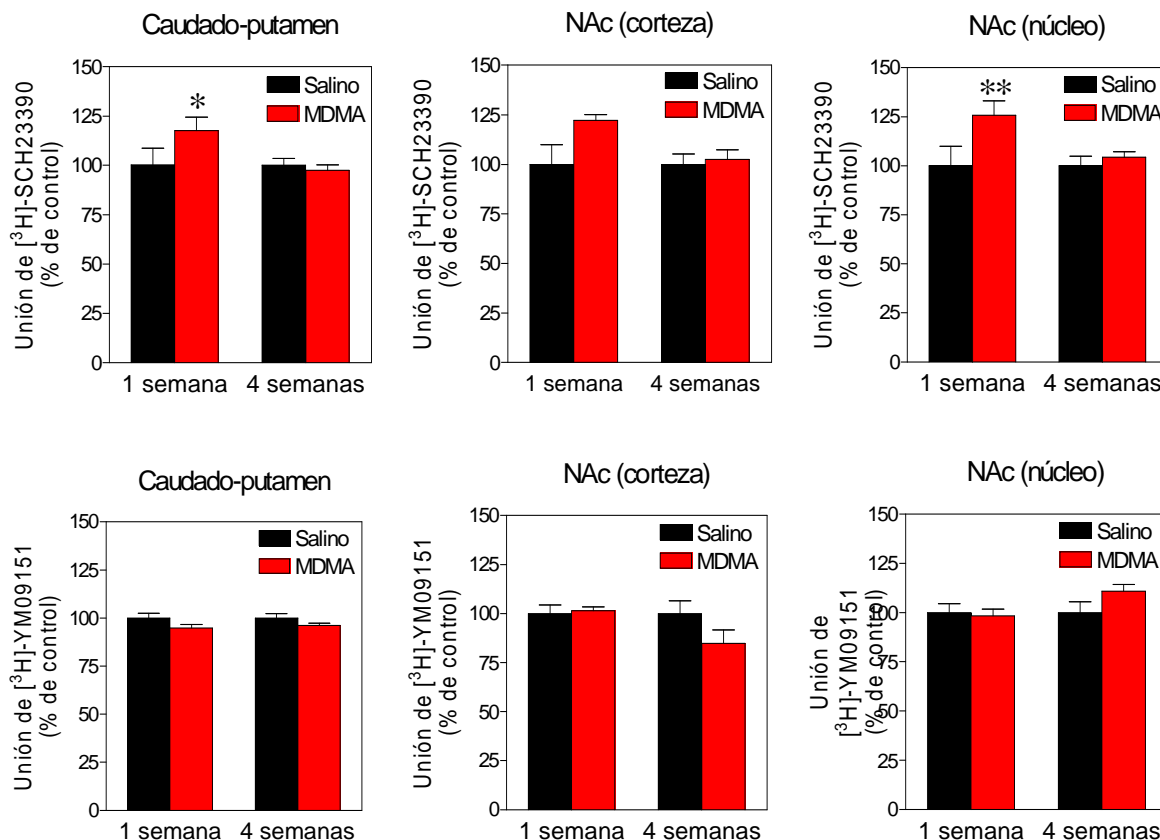


Figura 29: Autorradiografía cuantitativa de la unión de [3 H]-SCH23390 a receptores D_1 y de [3 H]-YM09151 a receptores D_2 en el caudado-putamen y en la corteza y el núcleo del núcleo accumbens (NAc) de ratones expuestos a MDMA o salino 1 y 4 semanas antes. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 5-8$). Diferencias respecto a ratones tratados con salino: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Los valores absolutos (fmol/mg tejido) para la densidad de receptores D_1 y D_2 fueron los siguientes: caudado-putamen, 172 ± 9 ($n = 14$) y 176 ± 3 ($n = 15$), respectivamente; Corteza del NAc, 146 ± 8 ($n = 14$) y 137 ± 5 ($n = 13$), respectivamente y núcleo del NAc, 152 ± 8 ($n = 14$) y 127 ± 5 ($n = 15$), respectivamente.

2.5. Consumo de sacarosa y quinina por ratones pre-tratados con una dosis neurotóxica de MDMA.

Para determinar si las diferencias en el consumo y preferencia por etanol pudieran reflejar cambios en las preferencias de sabor o en las necesidades calóricas producidas por MDMA, se realizaron estudios con sacarosa y quinina. La figura 30a muestra diferencias en la preferencia por sacarosa de acuerdo con la concentración en ratones controles, apareciendo la preferencia más alta con las dos concentraciones de sacarosa más elevadas (1,7 % y 4,25 %). Este perfil no fue alterado por el pre-tratamiento con MDMA.

Como era de esperar, la preferencia por quinina en los animales controles fue más baja que la de sacarosa. Además, la preferencia por la concentración más alta de quinina (0,1 mM) fue significativamente más baja que la observada para 0,03 mM, siendo el efecto similar en ratones pre-tratados con MDMA (figura 30b).

Al igual que en el experimento de consumo de etanol, no se observaron diferencias significativas en la temperatura rectal entre animales control y animales lesionados con MDMA durante todo el desarrollo del experimento (figura 31), así como tampoco se observaron diferencias en la ingesta de comida (figura 32a) ni en la ganancia de peso corporal (figura 32b).

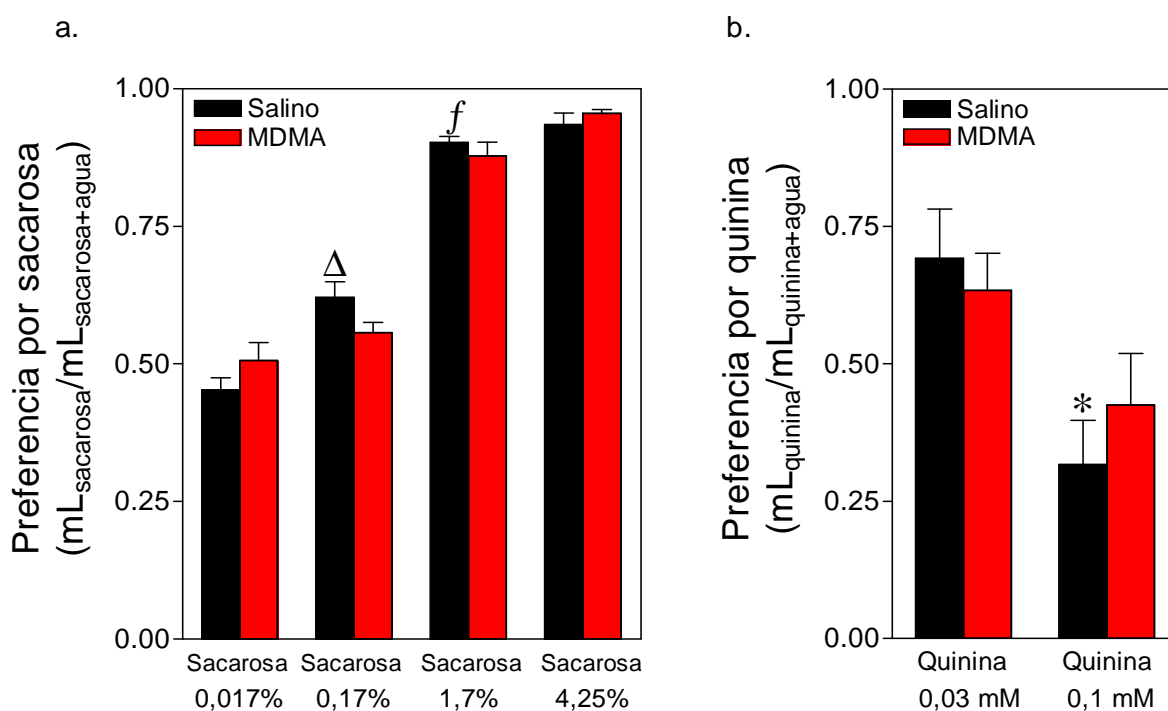


Figura 30: Preferencia por sacarosa (a) y quinina (b) en ratones inyectados con MDMA o salino 7 días antes de empezar el modelo de libre elección de dos botellas. Los ratones tuvieron 4 días de acceso a cada solución de sacarosa o quinina con un intervalo de 4 días entre la concentración más alta de sacarosa y la más baja de quinina. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 7-10$). Diferencias respecto al consumo de sacarosa 0,017 % en ratones pre-tratados con salino: $^{\Delta}P < 0,001$. Diferencias respecto al consumo de sacarosa 0,17 % en ratones pre-tratados con salino: $^fP < 0,001$. Diferencias respecto al consumo de quinina 0,03 mM en ratones pre-tratados con salino: $^*P < 0,05$.

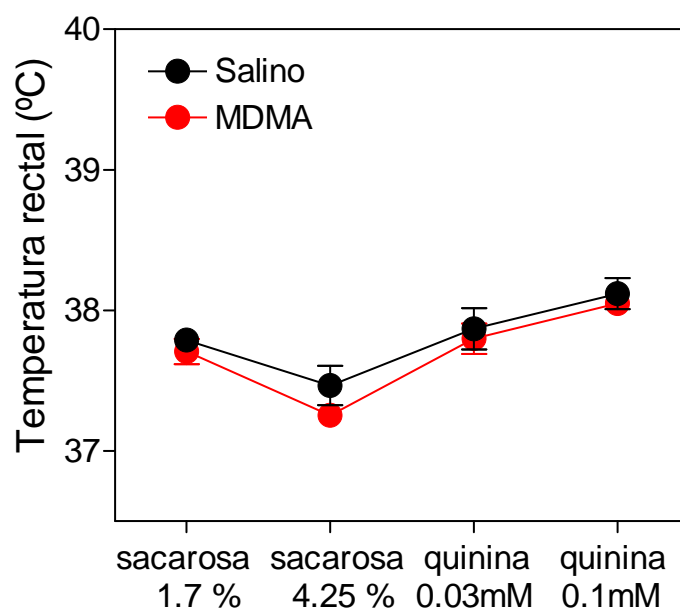


Figura 31: Temperatura rectal a lo largo del experimento de ratones pre-tratados con MDMA o salino 7 días antes de comenzar el test de consumo de sacarosa y quinina. Se midió la temperatura rectal de los animales los días 2 y 5 de cada intervalo de 5 días y se calculó la media de dicha temperatura rectal para cada concentración de sacarosa o quinina. No hubo diferencias significativas en la temperatura rectal entre ambos grupos experimentales a lo largo de todo el experimento [$F(1,20)=1,07$, $P=0,2777$]. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 10-12$ ratones).

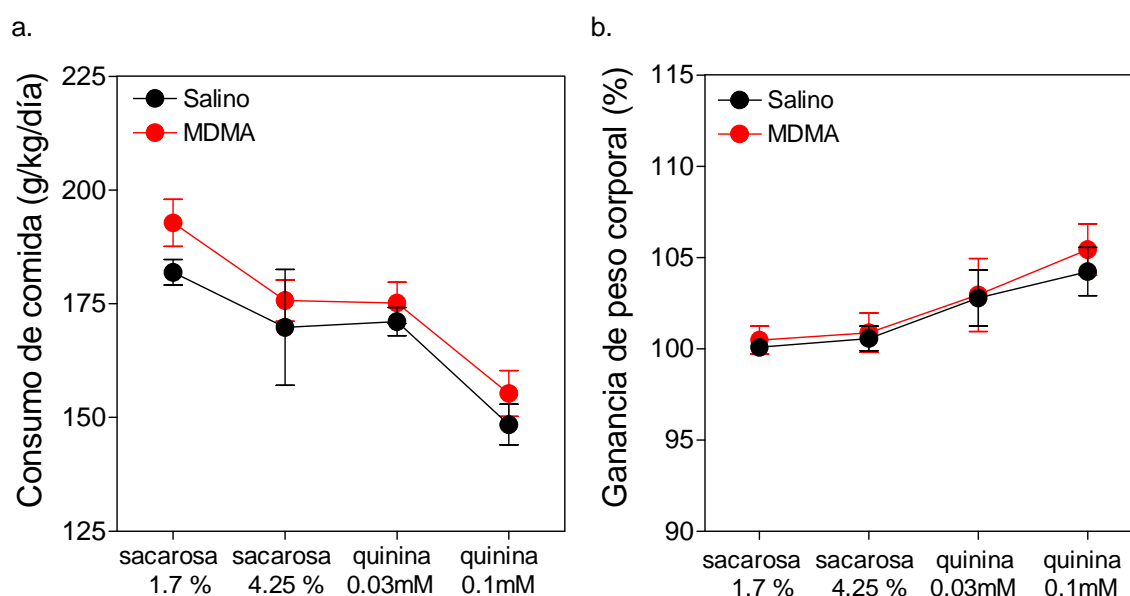


Figura 32: Ingesta de comida (a) y ganancia de peso corporal (b) a lo largo del experimento de ratones pre-tratados con MDMA o salino 7 días antes de comenzar el test de consumo de sacarosa y quinina. Se determinó la ingesta de comida y la ganancia de peso de los animales los días 2 y 5 de cada intervalo de 5 días y se calculó la media de dichos parámetros para cada concentración de sacarosa o quinina. No hubo diferencias significativas en el consumo de comida [$F(1,20)=2,418$, $P=0,103$] ni en la ganancia de peso corporal [$F(1,20)=0,258$, $P=0,595$] a lo largo de todo el experimento. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M (n = 10-12 ratones).

2.6. Efecto de la MDMA sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Ambos grupos de ratones pre-tratados con MDMA y con salino mostraron una reducción de la actividad locomotora en el 2º y 3º periodos de 10 min después de la inyección del salino y colocación de los animales en las arenas en comparación con el primer periodo de 10 min. Esta reducción de la actividad locomotora se corresponde a un declive del comportamiento exploratorio inicial de los roedores al ser colocados en un ambiente nuevo (figura 33).

La administración de etanol incrementó la actividad locomotora media al final del 2º (40 %) y 3º (80 %) periodos de 10 min, respectivamente, siendo el efecto similar en ratones pre-tratados con MDMA y pre-tratados con salino (figura 33).

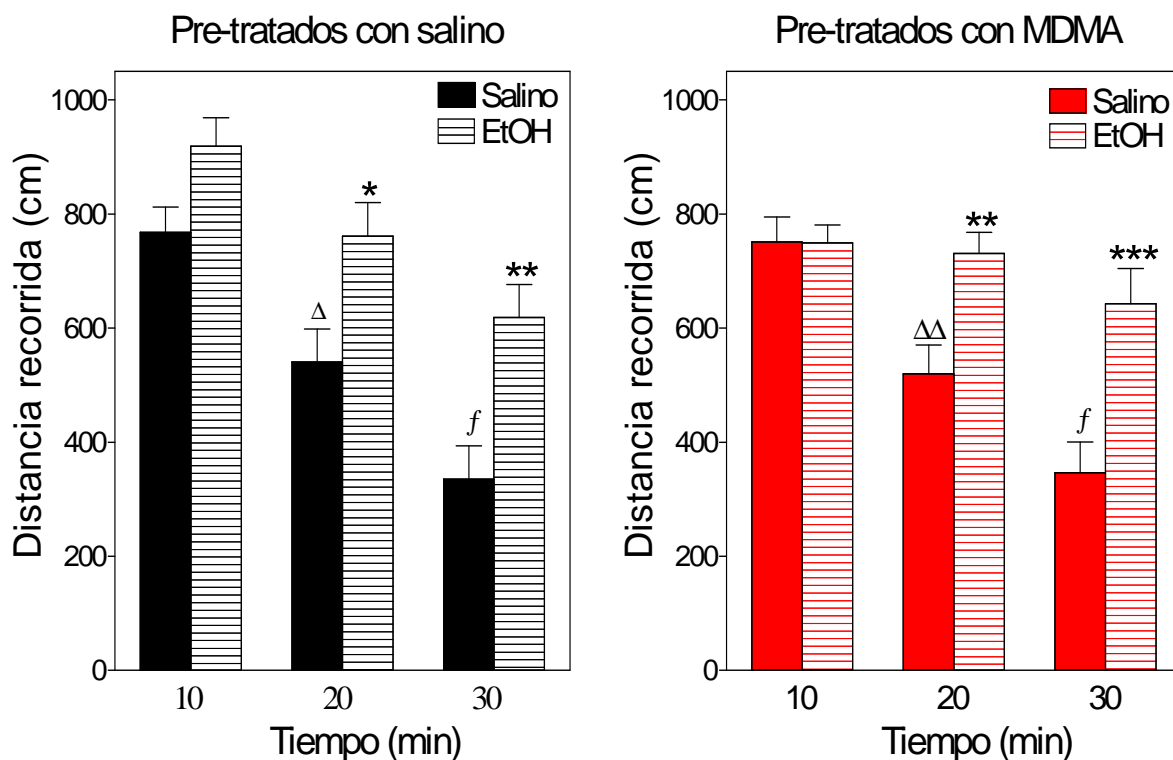


Figura 33: Efecto del etanol (EtOH, 1 g/kg, i.p.) sobre la actividad locomotora de ratones expuestos a MDMA o salino 3 semanas antes. Los ratones fueron situados en la cámara de actividad locomotora inmediatamente después de la inyección de etanol y se determinó la distancia total recorrida durante 30 min a intervalos de 10 min. Los ratones pre-tratados con salino y MDMA mostraron una reducción progresiva en la actividad locomotora a lo largo del periodo de 30min del test. La administración de etanol incrementó la locomoción 20 y 30 min después de la inyección tanto en ratones pre-tratados con salino como en ratones pre-tratados con MDMA. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M (n = 13-16). Diferencias respecto al grupo salino en el mismo intervalo: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Diferencias respecto al grupo salino del intervalo de 10 min: $\Delta P < 0,05$, $\Delta\Delta P < 0,01$. Diferencias respecto al grupo salino del intervalo de 20 min: $f P < 0,05$.

2.7. Efecto de la MDMA sobre el nivel de ansiedad.

No hubo diferencias significativas entre los ratones pre-tratados con salino y MDMA en ninguno de los parámetros medidos. El tiempo de latencia hasta la primera entrada del animal en el compartimento claro fue, para ratones pre-tratados con salino: $20 \pm 2,9$ s ($n = 16$) y para ratones pre-tratados con MDMA: $21 \pm 2,7$ s ($n = 19$). El tiempo total pasado en la caja oscura fue para ratones pre-tratados con salino: 181 ± 10 s ($n = 16$) y para ratones pre-tratados con MDMA: 183 ± 15 s ($n = 23$). El tiempo total pasado en el compartimento claro fue para ratones pre-tratados con salino: 119 ± 10 s ($n = 16$) y para ratones pre-tratados con MDMA: 117 ± 10 s ($n = 23$). El número total de transiciones fue para animales pre-tratados con salino: $17 \pm 1,3$ s ($n = 16$) y para animales pre-tratados con MDMA: $16 \pm 1,2$ s ($n = 23$). En tabla 8 se resumen los resultados observados.

Tabla 8: Efecto de la MDMA sobre el comportamiento de los animales en el test de ansiedad caja clara-oscuro. Los animales fueron tratados con MDMA o salino 3 semanas antes y se grabó el comportamiento del animal en la caja clara-oscuro durante 5 minutos. Se determinó el tiempo de latencia de la primera transición, el tiempo total en cada compartimento y el número total de transiciones entre ambos compartimentos. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos en ninguno de los parámetros medidos.

<i>Tratamiento</i>	<i>Latencia (s)</i>	<i>Tiempo total en la caja oscura (s)</i>	<i>Tiempo total en la caja clara (s)</i>	<i>Número de transiciones</i>
SALINO	20 ± 2,9	181 ± 10	119 ± 10	17 ± 1,3
MDMA	21 ± 2,7	183 ± 15	117 ± 10	16 ± 1,2

Los resultados se muestran como la media ± E.E.M. (n = 16-23).

2.8. Efecto de la MDMA sobre la sensibilidad al efecto hipnótico-sedante del etanol.

Puesto que la sensibilidad al etanol se correlaciona negativamente con el consumo de etanol en humanos y roedores, pensamos que la lesión dopaminérgica inducida por MDMA se podría relacionar con una menor sensibilidad a los efectos agudos del etanol.

Los ratones inyectados con salino respondieron al efecto hipnótico/sedante del etanol de una manera dosis dependiente, recuperando el reflejo de enderezamiento 24 y 42 min tras la administración de una dosis de etanol de 2,5 y 3 g/kg, respectivamente. Sin embargo, los animales pre-tratados con MDMA fueron menos sensibles al efecto sedante del etanol, recuperando dicho reflejo de enderezamiento antes que los ratones controles tras la inyección de 2,5 y 3 g/kg de etanol (figura 34).

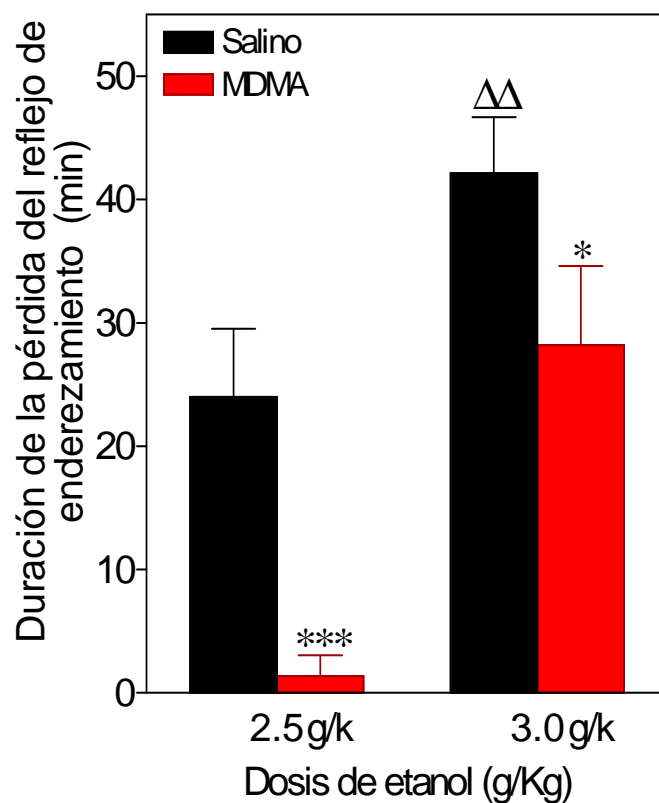


Figura 34: Duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento inducida por etanol en ratones inyectados con MDMA o salino 7 días antes. El tiempo que transcurre desde la aparición de la sedación inducida por etanol (2,5 y 3 g/kg) hasta el enderezamiento del ratón en sus 4 patas 3 veces en un intervalo de 30 s, fue usado como el índice de tiempo de recuperación del reflejo de enderezamiento. Diferencias respecto a ratones inyectados con salino: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. Diferente respecto a dosis de etanol de 2,5 g/kg en ratones pre-tratados con salino: $\Delta\Delta P < 0,01$. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n = 5-8 ratones).

2.9. Efecto de la MDMA sobre la tolerancia a la hipotermia inducida por etanol.

El etanol redujo significativamente la temperatura rectal en los animales inyectados con salino o con MDMA durante al menos 3 h. La hipotermia fue menos pronunciada en los animales pre-tratados con salino que habían recibido etanol 24 h antes (tolerancia rápida). Sin embargo, en ratones pre-tratados con MDMA no hubo diferencia entre los cambios inducidos por la primera y segunda administración de etanol (figura 35).

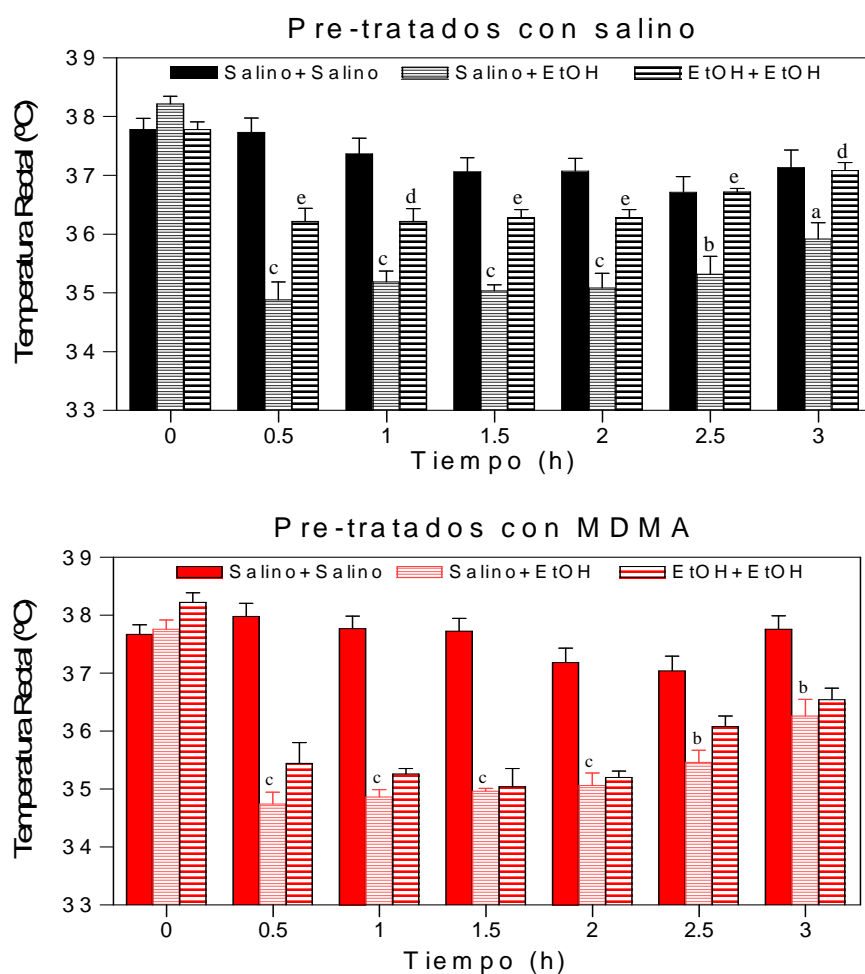


Figura 35: Desarrollo de tolerancia rápida a la hipotermia inducida por etanol (EtOH) en ratones pre-tratados con salino pero no en ratones pre-tratados con MDMA 7 días antes. Las gráficas representan el efecto de una segunda inyección de etanol (3 g/kg) en ratones que habían recibido una primera inyección (3 g/kg) el día anterior. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 6-10$). La administración de etanol a ratones tratados con salino 24 h antes produjo una marcada hipotermia tanto en ratones pre-tratados con salino como en ratones pre-tratados con MDMA. La administración de etanol a ratones tratados con etanol 24 h antes produjo una mayor hipotermia en ratones pre-tratados con MDMA que en ratones pre-tratados con salino. La respuesta hipotérmica a la segunda inyección de etanol fue más atenuada en comparación con la primera inyección en ratones pre-tratados con salino. Diferencias respecto a salino: ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$. Diferencias respecto a la primera dosis de etanol: ^d $P < 0,05$, ^e $P < 0,01$.

2.10. Efecto de la MDMA sobre los niveles de etanol en plasma.

Las diferencias observadas en la sensibilidad al efecto hipnótico-sedante del etanol y en el consumo y preferencia por etanol no parecen ser debidas a diferencias en el aclaramiento agudo de etanol ya que las concentraciones de etanol en plasma durante las 4,5 h siguientes a la administración de etanol (3 g/kg) no difirieron entre los animales pre-tratados con salino y pre-tratados con MDMA (figura 36).

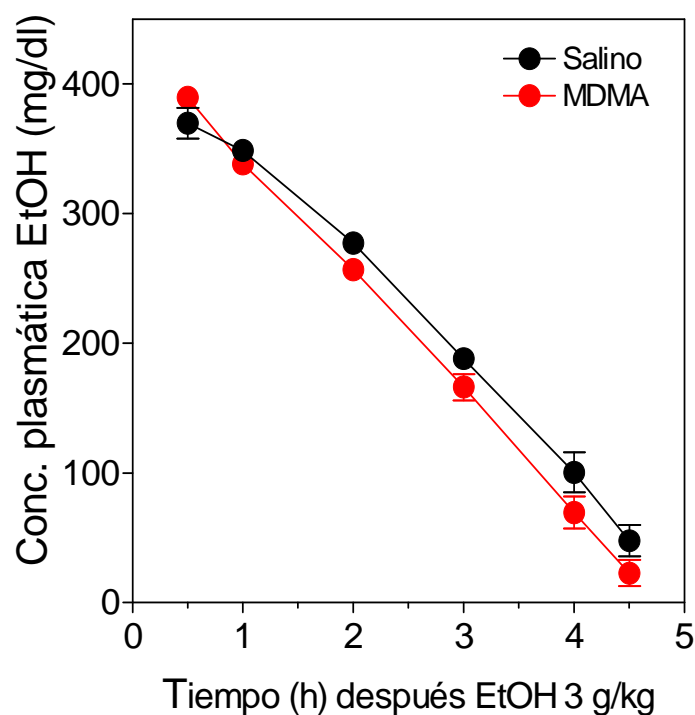


Figura 36: Concentraciones de etanol en plasma después de la inyección de etanol (3 g/kg) en ratones expuestos a MDMA o salino 7 días antes. Se recogieron las muestras de sangre de la cola de los animales hasta 4,5 h tras la inyección de etanol. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos, inyectados con MDMA y salino ($F(1,8)=1,99$, $P=0,1140$, n.s.). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n = 5$).

2.11. Efecto de la MDMA sobre la concentración de DA y la densidad de los lugares de recaptación de dopamina (DAT).

El último día de exposición a etanol, los ratones fueron sacrificados y diseccionados los estriados para evaluar el efecto inducido por la MDMA sobre los terminales dopaminérgicos y comprobar si este efecto estuviera alterado por el consumo de diferentes concentraciones de etanol. Cinco semanas después de su administración, la MDMA produjo una disminución del 56 % en el contenido de DA estriatal medido por h.p.l.c. y una reducción del 50 % en la densidad del transportador de DA en el estriado cuantificado por la unión del radioligando [³H]-WIN 34,428. Los niveles de DOPAC y HVA estaban reducidos aproximadamente un 30 %. Estos cambios fueron similares en ratones expuestos y no expuestos a etanol (figura 37).

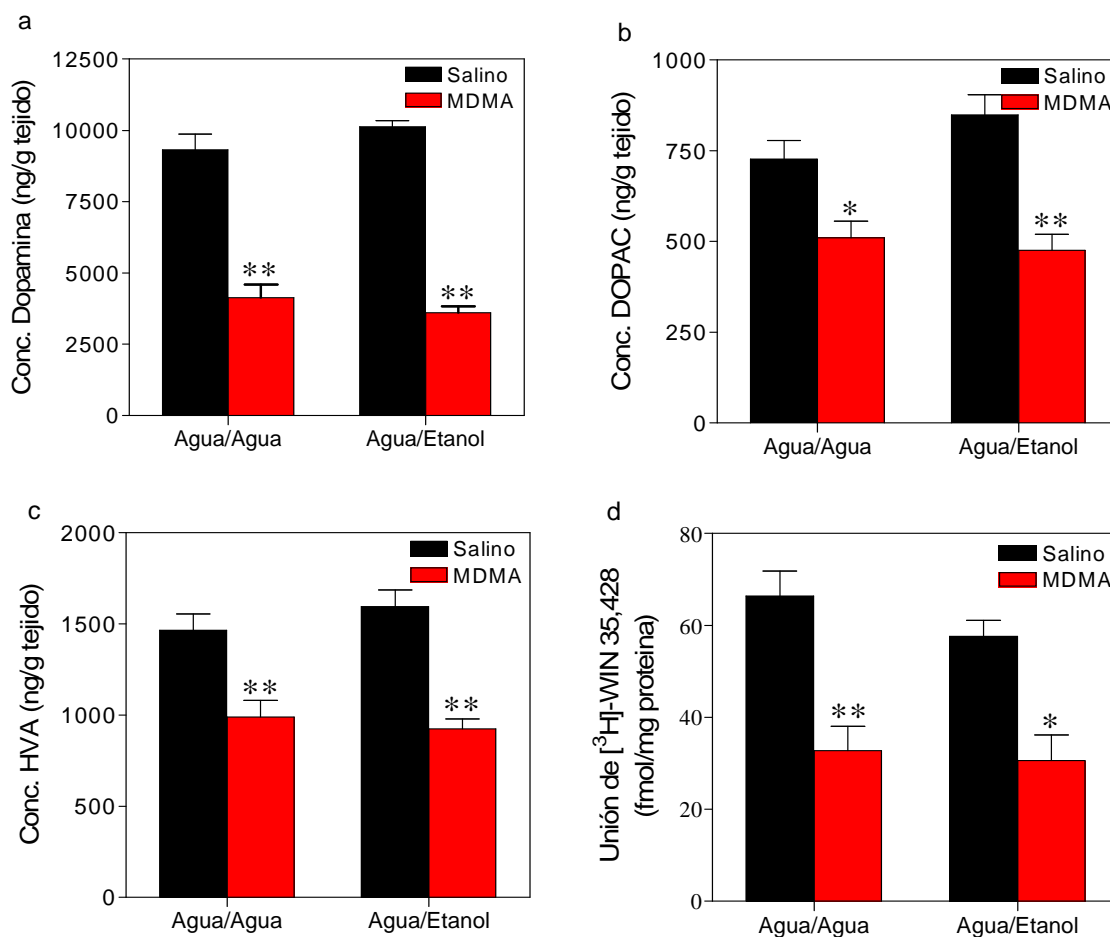


Figura 37: Concentración de (a) DA, (b) DOPAC, (c) HVA y (d) densidad del transportador de DA en el estriado de ratones pre-tratados con MDMA o salino 5 semanas antes. Siete días después de la administración de la droga, ambos grupos de ratones tuvieron acceso a dos pipetas conteniendo agua corriente y diferentes soluciones de etanol en agua (3, 6, 10 y finalmente 20 % v/v). La concentración de etanol fue incrementada cada 7 días. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n = 7-11). Diferencias respecto a los correspondientes ratones pre-tratados con salino: *P<0,01, **P<0,001.

V. Discusión

Estudio 1: Efecto de la pre-exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma sobre la lesión serotoninérgica inducida por MDMA en el cerebro de rata.

El trabajo que constituye la primera parte de esta Tesis Doctoral muestra por primera vez que la intoxicación repetida de etanol potencia la pérdida de terminales serotoninérgicos inducida por una dosis moderada de MDMA, cuando es administrada a una temperatura ambiente de 30 °C para reproducir las condiciones ambientales del consumo humano de dicha droga. En concreto, estos datos indican que animales mantenidos a niveles de etanol en plasma de 450 mg/dL durante 4 días consecutivos son más vulnerables a la neurotoxicidad inducida por MDMA, reflejada como una pérdida más pronunciada del contenido de 5-HT y de la densidad del transportador de 5-HT en el hipocampo, que los animales control, pre-expuestos a aire humidificado en lugar de vapor de etanol.

La MDMA es una droga recreativa de abuso ampliamente consumida por los jóvenes en discotecas y “raves”, ambientes multitudinarios y calurosos, y en el contexto de un claro patrón de policonsumo, de tal forma que los consumidores de éxtasis emplean otras sustancias con una frecuencia elevada, entre las que destaca el alcohol (Schifano y col., 1998; Winstock y col., 2001; Plan Nacional Sobre Drogas, 2004). Así, el 90 % de los consumidores de éxtasis ingieren también alcohol y el 70 % presenta niveles peligrosos de etanol en sangre (Winstock y col., 2001). Además, como ya se ha comentado en la introducción, se han producido cambios en los patrones de consumo de alcohol, de tal manera que, actualmente, entre los jóvenes, se ha extendido la costumbre de beber grandes cantidades de alcohol en periodos cortos de tiempo, dando lugar a un patrón de consumo denominado en inglés “binge drinking”, y entre nosotros, “atración”. En este estudio, el modelo de administración de etanol intenta simular este patrón de consumo. Con todo esto, resulta interesante estudiar los efectos neuroquímicos y comportamentales de la co-administración de ambas drogas.

Goldstein (1975) fue el primero en mostrar que concentraciones de etanol en plasma elevadas y estables pueden ser alcanzadas en ratones inyectados con *pirazol*, un potente inhibidor de la ADH, y mantenidos en una cámara sellada a través de la cual pasa vapor de etanol. Desafortunadamente, el pirazol representa un factor confuso, dado que puede ejercer efectos depresores del SNC no relacionados con el catabolismo del etanol así como potenciar el síndrome de abstinencia del mismo (Littleton, Griffiths y Ortiz, 1974). Además, tiene efectos tóxicos sobre el hígado y el SNC (Leblanc y Kalant, 1973; Goldstein, 1975). Posteriormente, Ferko y Bobyock (1977) diseñaron un método de inhalación de etanol con ratas que no implica el uso de pirazol. Este método de inhalación de vapores de etanol, en comparación con otros métodos como la dieta líquida o la administración intragástrica, es menos tedioso, más barato, capaz de producir elevadas concentraciones de etanol en plasma, cada día y a cada rata, y no requiere intervención agresiva. Por otro lado, para conseguir elevadas concentraciones de etanol en plasma mediante la

administración intraperitoneal de etanol deberíamos inyectar al animal un volumen demasiado elevado de líquido, pudiendo causar al mismo una hipervolemia fatal. De esta manera, decidimos elegir el método de inhalación como modelo de administración del etanol.

En primer lugar, este estudio indica que ratas mantenidas en una cámara de inhalación y expuestas a aire humidificado muestran una reducción en la temperatura rectal inmediatamente después de la exposición. Este efecto no es sorprendente, ya que se ha observado también en condiciones ambientales normales, cuando se monitoriza la temperatura corporal a lo largo del día y, principalmente, cuando las ratas son mantenidas sin manipulación durante algún tiempo (Orio y col., 2004). Pero además, los resultados muestran también que la exposición a elevadas concentraciones de etanol en plasma produce una disminución más pronunciada de la temperatura rectal, en comparación con las ratas expuestas a aire, siendo este efecto evidente únicamente en el primer día de tratamiento. En los días restantes, aparece una tolerancia al efecto hipotérmico del etanol, de tal manera que ratas expuestas a etanol muestran una temperatura rectal similar a la observada en ratas expuestas a aire, inmediatamente después de la exposición. No obstante, estos datos son consistentes con observaciones anteriores y confirman que la inducción de tolerancia puede aparecer después de una o dos administraciones de etanol (Crabbe y col., 1979; Maier y Pohorecky, 1987; Tampier y col., 2000).

Se ha comprobado que ciertos fármacos, como clometiazol y haloperidol, previenen la neurotoxicidad inducida por MDMA (Colado y col., 1993; Colado y Green, 1994), debido a que causan hipotermia o, al menos, previenen la hipertermia inducida por MDMA. Para evitar una posible interacción entre la hipotermia inducida por etanol y la hipertermia de la MDMA que probablemente influiría sobre el efecto neurotóxico, administramos la MDMA 24 h después de la última exposición a etanol.

Curiosamente, este estudio también indica que 24 h después de la última exposición a etanol y cuando son situadas a una temperatura ambiente elevada (30 °C), las ratas muestran una temperatura corporal más elevada que aquellas expuestas a aire. En este sentido, se ha observado que la administración aguda de altas dosis de etanol produce un estado de poiquilothermia y que el mantenimiento del animal a una temperatura ambiente elevada inmediatamente después de la inyección del etanol eleva la temperatura rectal del animal durante el tiempo de exposición a calor (Myers, 1981). Brattstrom (1970) utilizó por primera vez el término *poiquilothermia* para definir un estado fisiológico en el cual la temperatura de un animal se aproxima a la temperatura ambiente en la que es mantenido. Aunque algunas drogas o compuestos químicos pueden alterar la temperatura corporal de los animales en una dirección u otra (hiper/hipotermia), ciertos compuestos ejercen una acción claramente poiquilotérmica. Así, Myers (1981) realizó una serie de experimentos con el propósito de identificar los efectos neurofarmacológicos del etanol sobre la temperatura corporal de la rata y confirmó que el etanol afecta al sistema termorregulador del SNC, ejerciendo acciones

poiquilotérmicas.

Este efecto refleja una alteración de las respuestas fisiológicas compensatorias que median el control de la temperatura corporal, tales como la vasodilatación y la taquipnea (frecuencia respiratoria rápida), las cuales ocurren inmediatamente en respuesta a un cambio térmico. Esta alteración es suficiente para prevenir la pérdida de calor y, consecuentemente, causar una marcada hipertermia si la temperatura ambiente es elevada.

Como ya se ha comentado en la introducción, la administración de MDMA en la rata, a una temperatura ambiente estándar, produce una respuesta hipertérmica que se caracteriza por una elevación de la temperatura corporal de los animales de entre 1-2 °C, con un pico máximo a los 40-60 minutos tras la inyección de la droga. El papel y la importancia de esta respuesta hipertérmica en la neurotoxicidad inducida por MDMA en la rata ha sido un tema ampliamente estudiado. Así, es conocido que el grado de neurotoxicidad a largo plazo inducido por MDMA está estrechamente relacionado con la magnitud de la respuesta hipertérmica producida por la droga (Malberg y Seiden, 1998; Orio y col., 2004). Sin embargo, los cambios inducidos por etanol en la neurotoxicidad de la MDMA no parecen ser debidos a un efecto sobre la hipertermia inducida por MDMA, ya que animales expuestos a etanol mostraron una respuesta hipertérmica similar a la observada en ratas control tratadas sólo con MDMA, mientras que la pérdida del contenido de 5-HT y de la densidad del transportador de 5-HT en el hipocampo fue más pronunciada en aquellos. Además, cuando los animales son tratados con cianamida y expuestos a etanol, la hipertermia inducida por MDMA es claramente menor que la observada en animales expuestos a etanol, pero no inyectados con cianamida y, sin embargo, la pérdida de los marcadores serotoninérgicos en el hipocampo y corteza fueron más pronunciados. Por lo tanto, estos datos indican que el efecto potenciador del etanol sobre la neurotoxicidad de la MDMA no es debido a un efecto relacionado con cambios en la hipertermia aguda que produce la droga.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio indican que la intoxicación repetida de etanol no produce una pérdida a largo plazo de los terminales serotoninérgicos en el hipocampo ni en la corteza frontal. Existen numerosas evidencias experimentales que indican que la administración de un régimen de etanol que produce niveles de etanol en plasma similares, o incluso más bajos, que los obtenidos en este estudio, produce una pérdida neuronal principalmente en el hipocampo y en la corteza frontal (Collins y col., 1996; Obernier y col., 2002b; Zharkovsky y col., 2003; Hamelink y col., 2005). En estos estudios, el daño neuronal fue visualizado y cuantificado mediante técnicas de tinción de plata (Collins y col., 1996; Hamelink y col., 2005), métodos de elección para ensayar la neurodegeneración irreversible causada por una variedad de agresiones; sin embargo, estas técnicas tienen la desventaja de que no identifican la naturaleza del daño neuronal. Por lo tanto, en este estudio, la exposición a niveles de etanol en plasma de 450 mg/dL no produjo ningún efecto a largo plazo sobre la concentración de 5-HT ni sobre la densidad de los lugares de recaptación de

5-HT en el hipocampo y en la corteza, lo que indica una ausencia de efecto neurotóxico sobre las neuronas serotoninérgicas.

Los mecanismos implicados en el efecto potenciador del etanol sobre la neurotoxicidad de la MDMA no están totalmente establecidos todavía. Existe evidencia de que la MDMA a una dosis de 12,5 mg/kg, administrada a una temperatura ambiente estándar de 22 °C, incrementa la concentración extracelular de 2,3-DHBA y que este efecto está implicado en la neurotoxicidad a largo plazo de la MDMA (Colado y *col.*, 1997a; Shankaran y *col.*, 1999). Por otro lado, este estudio muestra que la administración de una dosis más baja de MDMA (5 mg/kg) a una temperatura ambiente elevada también aumenta la concentración extracelular de 2,3-DHBA, y que el pre-tratamiento con etanol potencia este aumento en la formación de 2,3-DHBA inducido por MDMA en el dializado hipocampal, lo que podría explicar el efecto potenciador del etanol sobre la neurotoxicidad de la MDMA. Además, la administración aguda de etanol produce una disminución dosis dependiente en la actividad de la superóxido dismutasa en todas las fracciones subcelulares cerebrales y en la actividad de la catalasa en la mitocondria cerebral (Reddy y *col.*, 1999). La superóxido dismutasa cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Freeman y Crapo, 1982; Fridovich, 1989), mientras que la catalasa usa el glutatión para la reducción del H_2O_2 a H_2O . Por lo tanto, parece razonable pensar que el incremento en la formación de radicales libres inducido por MDMA podría ser debido a una disminución de la actividad de los principales sistemas antioxidantes celulares causada por la exposición previa a etanol.

Existen numerosas evidencias que indican que el acetaldehído media algunos de los efectos comportamentales y centrales del etanol, tales como el dolor de cabeza, las náuseas, la inducción de sedación y sueño (Eriksson, 2001; Zimatkin y *col.*, 2001a, b), así como también se ha implicado en el mecanismo de neurotoxicidad del etanol (Pratt y *col.*, 1990; Harper y *col.*, 1994). Para evaluar la contribución del acetaldehído al efecto potenciador del etanol sobre la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA, un grupo de ratas fueron inyectadas con cianamida (un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa) los días 1 y 3 de los 4 días de exposición a etanol y la MDMA fue administrada 24 h después de la última exposición a etanol. De acuerdo con estudios previos, la administración de cianamida eleva las concentraciones de acetaldehído en plasma entre 5 y 7 veces por encima de las observadas en ratas tratadas únicamente con etanol (Deitrich y *col.*, 1976; Kinoshita y *col.*, 2002), lo cual se confirma en este estudio. En estas ratas, la MDMA produjo una pérdida de la densidad del transportador de 5-HT en el hipocampo más pronunciada que la observada en ratas tratadas únicamente con etanol e indujo la aparición de daño en la corteza frontal, por lo que se confirma la implicación del acetaldehído en el efecto potenciador del etanol sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA.

La habilidad del acetaldehído para cruzar la barrera hematoencefálica ha sido ampliamente cuestionada. No existe un factor limitante desde el punto de vista fisicoquímico (Quertemont y

Tambour, 2004); sin embargo, la presencia de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) en la microvasculatura cerebral proporciona una barrera metabólica que limita la difusión del acetaldehído a través de la barrera hematoencefálica (Zimatkin, 1991). Por esta razón, los niveles de acetaldehído detectados en el cerebro tras la administración de etanol son bajos y derivados principalmente del metabolismo del etanol en el cerebro. No obstante, concentraciones elevadas de acetaldehído en plasma, tales como las alcanzadas en este estudio tras la inhibición periférica de la ALDH, son capaces de saturar la barrera metabólica proporcionada por la ALDH presente en la microvasculatura cerebral, la cual es también inhibida por la administración de cianamida. Por lo tanto, bajo estas condiciones experimentales, se esperarían elevados niveles cerebrales de acetaldehído capaces de ejercer una acción farmacológica y potenciar la neurotoxicidad inducida por MDMA en ratas expuestas a etanol. De esta manera, aunque después de la administración de etanol, el acetaldehído producido periféricamente podría ser rápidamente metabolizado en la barrera hematoencefálica antes de penetrar en el tejido cerebral, en bebedores con consumos abusivos de etanol, deficientes en la ALDH, el riesgo de daño neuronal tras MDMA podría ser aumentado debido a la presencia de altos niveles de acetaldehído en el cerebro.

La cianamida inhibe también la actividad de la catalasa tanto en el hígado como en el cerebro. Por lo tanto, parece razonable pensar también que el potenciamiento del daño neurotóxico inducido por MDMA observado en animales tratados con etanol y cianamida podría atribuirse a unos niveles cerebrales de etanol más elevados, causados por la inhibición de su metabolismo a través de la catalasa. Sin embargo, la actividad enzimática de la catalasa en el hígado es 45-60 veces más alta que la observada en el cerebro (Yang y Lin, 2002; Kaushik y Kaur, 2003) y la inhibición de esta actividad en la periferia no altera los niveles plasmáticos de etanol comparados con los observados en animales expuestos sólo a etanol (este estudio). Esto indica que el metabolismo del etanol sigue otras vías metabólicas. Consecuentemente, no existen razones para asumir que la neurotoxicidad más pronunciada encontrada en animales tratados con etanol y cianamida sea debida a niveles más altos de etanol en el cerebro, debidos a la inhibición de la actividad de la catalasa cerebral.

En resumen, este estudio demuestra que la intoxicación repetida de etanol potencia el daño neuronal a largo plazo inducido por MDMA, por un mecanismo que no se relaciona con cambios en la hipertermia aguda que produce la droga, sino que parece estar relacionado con la formación de radicales hidroxilo. Además, la magnitud de este efecto es dependiente de la concentración de acetaldehído en plasma, lo que sugiere que la neurotoxicidad inducida por MDMA podría ser más pronunciada en aquellos individuos deficientes en la ALDH con un patrón de consumo excesivo de alcohol.

Estudio 2: Efecto producido por la lesión dopaminérgica inducida por MDMA en el cerebro del ratón sobre el consumo y la preferencia por etanol.

El trabajo que constituye la segunda parte de esta Tesis Doctoral muestra que ratones pre-expuestos a una dosis neurotóxica de MDMA y que, consecuentemente, presentan una disminución a largo plazo del contenido de DA y de la densidad del DAT, exhiben un mayor consumo y preferencia por etanol en comparación con animales control, tratados con salino. La preferencia por etanol fue mayor de 0,5, lo que indica una alta preferencia por etanol.

Estas diferencias entre animales inyectados con salino y MDMA no parecen ser debidas a un cambio global en la preferencia de sabor o en las necesidades calóricas, ya que ratones lesionados con MDMA mostraron un consumo de las soluciones conteniendo tanto sacarosa como quinina similar al observado en animales pre-tratados con salino. Las preferencias por etanol, sacarosa y quinina concuerdan con las descritas previamente (Naasila y col., 2004; Lewis y col., 2005). Además, este estudio muestra que animales inyectados con MDMA y salino no presentan diferencias en el volumen de fluido total consumido, lo que indica que el aumento en el consumo de etanol observado en animales lesionados con MDMA no es debido tampoco a un incremento en la cantidad total de fluido ingerido. La ingesta de comida fue similar entre ambos grupos, de tal manera que la alteración en el consumo de etanol tampoco resulta de cambios en el apetito.

Resultados procedentes de estudios realizados en animales y humanos indican que las propiedades ansiolíticas del etanol podrían jugar un papel importante en el comportamiento de búsqueda del etanol (Thomas y col., 2003) y que los problemas de ansiedad preceden al abuso de alcohol (Cox y col., 1990). Además, un estudio reciente muestra que la metanfetamina, otra droga que también produce daño dopaminérgico a largo plazo, induce comportamientos relacionados con la ansiedad que persisten al menos durante 5 días tras la administración de la droga (Hayase y col., 2005). De esta manera, dadas las propiedades ansiolíticas del etanol (Stewart y col., 1993), pensamos que las diferencias observadas en el consumo de etanol en esta Tesis Doctoral podrían relacionarse también con diferencias en el nivel basal de ansiedad entre ratones inyectados con salino y MDMA, de tal manera que los ratones lesionados con MDMA consumieran más alcohol para modular su ansiedad. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el pre-tratamiento con MDMA no altera el comportamiento de los animales en el test de la caja clara-oscuro, 3 semanas después de su administración, tiempo al cual el consumo de etanol es mayor que el observado en ratones inyectados con salino. No obstante, aunque otros estudios han mostrado que la MDMA causa una actividad ansiogénica en el ratón, medida por el laberinto en cruz elevado (Navarro y Maldonado, 2002) y la caja clara-oscuro (Maldonado y Navarro, 2000), es necesario puntualizar que estos tests fueron desarrollados a corto plazo tras la administración de la droga, y no existen otros datos acerca de los efectos de la MDMA sobre la ansiedad a largo plazo, que los obtenidos en esta

Tesis Doctoral. Por lo tanto, es razonable proponer que el aumento en el consumo de etanol observado en animales lesionados con MDMA no es debido a un aumento en el nivel de ansiedad.

Por otro lado, se ha sugerido que existe una correlación entre la sensibilización a los efectos locomotores y la ingesta de drogas de abuso, incluido el etanol (Lessov y *col.*, 2001). En este sentido, tras la administración repetida de etanol se produce tanto una sensibilización a los efectos estimulantes de la actividad locomotora inducidos por etanol como un aumento del consumo voluntario de etanol (Kampov-Polevoy y *col.*, 2000; Correa y *col.*, 2003); pero además, la sensibilización también aparece tras la pre-exposición a otras drogas distintas al etanol, como por ejemplo tras la administración repetida de cocaína o morfina (Lessov y Phillips, 2003). De esta manera, parece razonable pensar que las diferencias en el consumo de etanol podrían relacionarse con una sensibilización a los efectos estimulantes de la actividad locomotora del etanol inducida por la pre-exposición a MDMA. Así, evaluamos la relación existente entre el consumo voluntario de etanol y los efectos locomotores del etanol en ratones lesionados con MDMA. El etanol indujo un incremento de la actividad locomotora en animales lesionados con MDMA similar al observado en animales control, inyectados con salino. Por lo tanto, estos resultados indican que la administración repetida de MDMA (30 mg/kg, 3 veces cada 3 h) no induce sensibilización a los efectos estimulantes de la locomoción inducidos por etanol.

Este estudio muestra también que la administración del agonista D₁ SKF81297 reduce el consumo de etanol en ratones lesionados con MDMA, lo que sugiere que las diferencias observadas entre animales pre-tratados con MDMA y salino son debidas a una reducción de la estimulación de receptores D₁, como consecuencia del déficit de la neurotransmisión dopaminérgica inducida por MDMA. Además, este efecto del agonista dopaminérgico fue revertido por el antagonista D₁ SCH23390, lo que confirma las acciones específicas del agonista sobre el receptor D₁. Por otro lado, los datos obtenidos en este estudio coinciden con datos de consumo obtenidos previamente en estudios farmacológicos que usan agonistas dopaminérgicos (Dyr y *col.*, 1993; Ng y George, 1994). Con todo esto, parece razonable concluir que las diferencias en el consumo de etanol se relacionan con la hipofunción dopaminérgica inducida por el pre-tratamiento con MDMA.

Estudios previos han descrito que la administración de MDMA provoca, 7 días después de su administración, tiempo al cual comienza la exposición a etanol, una disminución del contenido estriatal de DA y de la densidad de los lugares de recaptación de DA (Mann y *col.*, 1997; Escobedo y *col.*, 2005). La pérdida de dichos marcadores dopaminérgicos inducida por MDMA refleja una degeneración neurotóxica de los terminales que contienen DA similar a la observada tras la administración de metanfetamina, tanto a ratas como a ratones (Green y *col.*, 1992; Baldwin y *col.*, 1993; Itzhak y Ali, 1996). Además, este estudio amplía los resultados anteriores mostrando que la reducción del contenido de DA y del transportador de DA inducida por MDMA persiste, al menos, durante 5 semanas después de la administración de la droga. No obstante, es posible que exista

algún grado de recuperación, ya que la pérdida del contenido de DA observada 7 días tras la administración de la MDMA (90 %, Escobedo y *col.*, 2005) es más pronunciada que la observada 5 semanas después de su administración (56 %, este estudio). Por otro lado, este estudio muestra también que la hipofunción dopaminérgica inducida por MDMA es consistente con una regulación al alza de receptores D₁ observada en el caudado putamen y en el núcleo ("core") del núcleo accumbens una semana después de la administración de MDMA. Los receptores D₁ están restringidos a una localización post-sináptica, y una disminución del contenido de DA lleva normalmente a un aumento de la densidad de dicho receptor bajo diferentes condiciones experimentales (Betarbet y Greenamyre, 2004). Sin embargo, los receptores D₂ presentan una localización tanto pre- como post-sináptica, y una hipotética regulación al alza a nivel post-sináptico inducida por MDMA podría estar compensada por una disminución de la densidad de los receptores D₂ pre-sinápticos como resultado de la pérdida de terminales dopaminérgicos. No obstante, aunque la reducción del contenido de DA y de la densidad del transportador de DA inducida por MDMA persiste al menos durante 5 semanas, no existen cambios en la densidad del receptor D₁ 4 semanas después de la administración de la MDMA, sugiriendo que cambios tempranos en la densidad del receptor de DA pueden reflejar adaptaciones compensatorias reversibles en respuesta a la pérdida del contenido de DA.

Interesantemente, el consumo de etanol no alteró la disminución en la concentración de DA, DOPAC y HVA observada en el estriado de ratones lesionados con MDMA, así como tampoco modificó el contenido de catecoles en el grupo control. Estos resultados han sido observados previamente por Yoshimoto y Komura (1989), quienes también mostraron que el consumo voluntario de etanol (etanol 10 %), usando el modelo de libre elección de dos pipetas, no altera los niveles de DA durante el tiempo de exposición (4 semanas), en ratones C57BL/6J. Sin embargo, estos mismos autores observaron en ratones poco preferentes por etanol, ratones DBA/2Cr, un aumento significativo en los niveles de DA tras el consumo de etanol. No obstante, existen alteraciones genéticas en la expresión y en la función del receptor de DA en las vías mesolímbica y nigroestriatal de ratones C57BL/6J en comparación con los DBA/2Cr, las cuales podrían explicar estas diferencias (Ng y *col.*, 1994).

Además de una reducción en los marcadores dopaminérgicos, los ratones pre-tratados con MDMA mostraron también cambios funcionales en el sistema mesolímbico, reflejados como una disminución en la liberación basal de DA en el núcleo accumbens, en comparación con animales inyectados con salino. Estos cambios podrían ser consecuencia de la reducida actividad dopaminérgica debida a la pérdida de los terminales dopaminérgicos inducida por la droga. Por otro lado, está ampliamente descrito que la administración periférica de etanol eleva la liberación de DA en el núcleo accumbens de ratones pre-tratados con salino (Yoshimoto y *col.*, 1992a,b; Kiianmaa y *col.*, 1995; este estudio); sin embargo, esta respuesta fue casi abolida en ratones pre-tratados con

MDMA, siendo este hecho otra evidencia más de la existencia de un desorden de la función dopaminérgica (este estudio). De esta manera, el hecho de que estos animales lesionados con MDMA consumieran más etanol debería estar en desacuerdo con la hipótesis de que el sistema mesolímbico dopaminérgico media las acciones reforzantes de las drogas de abuso (Gatto y col., 1994). Sin embargo, la exposición crónica a etanol aumenta la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica a los efectos estimulantes del etanol (Brodie, 2002), de tal manera que la exposición crónica a etanol puede aumentar el consumo del mismo. Esto es exactamente lo que observamos en ratones inyectados con salino. Ahora bien, en los ratones lesionados con MDMA se observa una ingesta de alcohol que es superior a la que se observa en animales control. Este efecto podría atribuirse también a un aumento en la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica que en este caso estaría mediada no sólo por la exposición crónica a etanol sino también por la hipofunción dopaminérgica producida por la droga. De hecho, como ya se ha comentado, la hipofunción dopaminérgica inducida por MDMA da lugar a un aumento en la densidad de receptores D_1 en el núcleo accumbens una semana después de la administración de MDMA. Además, aunque esta regulación al alza de receptores D_1 no se observa 4 semanas después de la administración de MDMA, es posible que existan alteraciones en las vías de señalización intracelular, que contribuyan a aumentar la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas en el sistema mesolímbico.

Estas diferencias en el consumo de etanol y en la liberación de DA inducida por etanol no se relacionan con cambios en el metabolismo del etanol, ya que las concentraciones de etanol en plasma en ratones pre-tratados con MDMA no difirieron de las observadas en animales control inyectados con salino durante las 4,5 horas tras la administración de una única dosis de etanol.

Por otro lado, existe una fuerte evidencia que indica que el consumo de etanol en humanos y roedores se correlaciona negativamente con la sensibilidad inicial al etanol y que, como consecuencia, altos niveles de etanol consumidos podrían asociarse con resistencia a los efectos fisiológicos producidos por esta sustancia (Harris y col., 1995; Schuckit y smith, 1996; Hodge y col., 1999; Thiele y col., 2000). De esta manera, ratones con la proteína quinasa A mutada exhiben un consumo alto de etanol y una baja sensibilidad a la sedación inducida por etanol (Thiele y col., 2000). De la misma manera, ratones knockout carentes de la nNOS así como aquellos carentes de los receptores de adenosina A_{2A} son menos sensibles al efecto sedante del etanol y consumen más etanol que los ratones salvajes (Naasila y col., 2002; Spanagel y col., 2002). En contraste, ratones knockout carentes del gen que codifica para el receptor de cannabinoides CB1 muestran una menor auto-administración de etanol y una mayor sensibilidad a sus efectos (Naassila y col., 2004). Por su parte, los resultados de este estudio muestran que la administración repetida de MDMA hace a los ratones más resistentes a los efectos agudos del etanol así como menos sensibles a la sedación inducida por la administración aguda de etanol. Esta menor sensibilidad a los efectos agudos del

etanol se asocia también con una resistencia al desarrollo de rápida tolerancia a la hipotermia inducida por etanol. Así, los resultados muestran que existe una clara diferencia entre los ratones pre-tratados con salino y MDMA en el desarrollo de tolerancia a la hipotermia tras la administración repetida de etanol durante 2 días consecutivos. La hipotermia fue menos pronunciada en animales pre-tratados con salino los cuales habían recibido etanol 24 h antes (rápida tolerancia). Sin embargo, en los ratones lesionados con MDMA no hubo diferencias entre los cambios de temperatura inducidos por la primera y segunda administración de etanol. La existencia de una correlación entre la sensibilidad a los efectos agudos inducidos por etanol y la adquisición de tolerancia ya ha sido mostrada previamente, si bien los mecanismos no están del todo esclarecidos (Tabakoff y Culp, 1984; Crabbe, 1994; Crabbe y col., 1996; Browman y col., 2000). Así, líneas de ratones insensibles a los efectos hipotérmicos de una inyección aguda de etanol, son resistentes al desarrollo de tolerancia a este efecto, mientras que aquellos sensibles a los efectos agudos desarrollan tolerancia rápidamente (Browman y col., 2000). Esta asociación también ha sido descrita en ratas, ya que la cepa M520, que es inicialmente más sensible a los efectos de incoordinación del etanol, desarrolla tolerancia a una velocidad mayor que aquellas que muestran mayor resistencia a dichos efectos (Tobakoff y Culp, 1984).

En resumen, este estudio muestra por primera vez que la neurotoxicidad dopaminérgica a largo plazo inducida por MDMA predispone a los ratones a un mayor consumo voluntario de etanol y sugiere que estos ratones requieren consumir niveles mayores de etanol para alcanzar efectos reforzantes similares a los obtenidos por los ratones no lesionados. No obstante, este estudio no descarta la posibilidad de que los sistemas cannabinoide y opioide participen en el consumo de ratones lesionados con MDMA. Además, la MDMA hace a los ratones menos sensibles al efecto hipnótico inducido por etanol y resistentes al desarrollo de rápida tolerancia a la hipotermia. Los datos de que se dispone actualmente indican que la MDMA no ejerce un efecto neurotóxico sobre las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del consumidor, sin embargo, estudios de neuroimagen han demostrado que los consumidores habituales de metanfetamina muestran una menor densidad del transportador de DA que podría estar reflejando una reducción en el número de terminales dopaminérgicos. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que el desorden de la función dopaminérgica inducida por la metanfetamina en seres humanos podría favorecer el consumo excesivo de etanol.

VI. Conclusiones

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Estudio 1: Efecto de la pre-exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma sobre la lesión serotoninérgica inducida por MDMA en el cerebro de la rata.

1. La intoxicación repetida de etanol potencia la neurotoxicidad sobre los axones serotoninérgicos inducida por MDMA a largo plazo en el hipocampo de la rata.
2. El mecanismo por el cual la intoxicación repetida de etanol potencia el daño neuronal que produce la MDMA no está asociado con la hipertermia aguda que produce la droga, sino que parece estar relacionado con una mayor generación de radicales hidroxilo.
3. La administración de cianamida potencia el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad producida por MDMA en el hipocampo y provoca la aparición de daño en la corteza cerebral, lo que sugiere la participación del acetaldehído en la neurotoxicidad que produce la MDMA en animales pre-expuestos a etanol.

Estudio 2: Efecto producido por la lesión dopaminérgica inducida por MDMA en el cerebro del ratón sobre el consumo y la preferencia por etanol.

4. La neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MDMA a largo plazo en el ratón predispone a un mayor consumo voluntario y preferencia por etanol, que no se debe a cambios en la preferencia de sabor ni en las necesidades calóricas. Tampoco es atribuible a diferencias en el nivel basal de ansiedad ni a una sensibilización a los efectos estimulantes de la actividad locomotora del etanol inducidos por la pre-exposición a MDMA.
5. La administración del agonista de receptores D₁ SKF81297 reduce el consumo de etanol en ratones lesionados con MDMA; efecto que es revertido por la administración del antagonista de receptores D₁ SCH23390. Estos datos sugieren que el aumento en el consumo y preferencia por etanol observado en ratones lesionados con MDMA se debe a una reducción de la estimulación de receptores D₁, como consecuencia del déficit de la neurotransmisión dopaminérgica inducida por MDMA.
6. La neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MDMA a largo plazo hace a los ratones más resistentes al efecto hipnótico-sedante y al desarrollo de rápida tolerancia a la hipotermia inducidos por etanol.

VII. Bibliografía

Referencias

- Adams K.M., Gilman S., Koeppe R.A., Kluin K.J., Brunberg J.A., Dede D., Berent S. y Kroll P.D. (1993) Neuropsychological deficits are correlated with frontal hypometabolism in positron emission tomography studies of older alcoholic patients. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 205-10.
- Aguirre N., Galbete J.L., Lasheras B. y Del Rio J. (1995) Methylenedioxymethamphetamine induces opposite changes in central pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **281**, 101-5.
- Aguirre N., Ballaz S., Lasheras B. y Del Rio J. (1998a) MDMA ('Ecstasy') enhances 5-HT_{1A} receptor density and 8-OH-DPAT-induced hypothermia: blockade by drugs preventing 5-hydroxytryptamine depletion. *Eur. J. Pharmacol.* **346**, 181-8.
- Aguirre N., Barrionuevo M., Lasheras B. y Del Rio J. (1998b) The role of dopaminergic systems in the perinatal sensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1159-65.
- Aguirre N., Barrionuevo M., Ramirez M.J., Del Rio J. y Lasheras B. (1999) Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity. *Neuroreport*. **10**, 3675-80.
- Alari L., Sjoquist B. y Lewander T. (1987) Ethanol-induced hypothermia and biogenic amine metabolites. *Drug Alcohol Depend.* **19**, 369-73.
- Albano E., Tomasi A., Gorla-Gatti L. y Dianzani M.U. (1988) Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem. Biol. Interact.* **65**, 223-34.
- Allen R.P., Wagman A.M. y Funderburk F.R. (1977) Slow wave sleep changes: alcohol tolerance and treatment implications. *Adv. Exp. Med. Biol.* **85A**, 629-40.
- Amanvermez R. y Agara E. (2006) Does ascorbate/L-Cys/L-Met mixture protect different parts of the rat brain against chronic alcohol toxicity? *Adv. Ther.* **23**, 705-18.
- Andersen P. y Baumberg B. (2006) El alcohol en Europa. Una perspectiva de salud pública. Reino Unido: Institute of alcohol studies.
- Aragon C.M., Stotland L.M. y Amit Z. (1991) Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **15**, 165-9.
- Aragon C.M., Rogan F. y Amit Z. (1992a) Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 93-8.
- Arrue A., Ruiz-Ortega J.A., Ugedo L. y Giralt M.T. (2003) Short-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on noradrenergic activity in locus coeruleus and hippocampus of the rat. *Neurosci. Lett.* **337**, 123-6.
- Assuncao M., de Freitas V. y Paula-Barbosa M. (2007a) Grape seed flavanols, but not Port wine, prevent ethanol-induced neuronal lipofuscin formation. *Brain Res.* **1129**, 72-80.
- Assuncao M., Santos-Marques M.J., de Freitas V., Carvalho F., Andrade J.P., Lukoyanov N.V. y Paula-Barbosa M.M. (2007b) Red wine antioxidants protect hippocampal neurons against ethanol-induced damage: A biochemical, morphological and behavioral study. *Neuroscience* **146**, 1581-92.
- Aston J.C. y Elliott J.M. (2002) Paroxetine modulates the expression of the immediate early gene arc induced by MDMA in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 346P.
- Augustyniak A., Michalak K. y Skrzydlewska E. (2005) [The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS)]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **59**, 464-71.
- Aydin S., Ozaras R., Uzun H., Belce A., Uslu E., Tahan V., Altug T., Dumen E. y Senturk H. (2002) N-acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *Tohoku J. Exp. Med.* **198**, 71-7.
- Azmitia E.C., Murphy R.B. y Whitaker-Azmitia P.M. (1990) MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca²⁺(+)-dependent toxicity linked to release. *Brain Res.* **510**, 97-103.
- Badanich K.A., Maldonado A.M. y Kirstein C.L. (2007) Chronic ethanol exposure during adolescence increases basal dopamine in the nucleus accumbens septi during adulthood. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 895-900.

- Badawy A.A., Evans M. y Punjan N.F. (1980) Enhancement of rat brain metabolism of a tryptophan load by chronic ethanol administration. *Br. J. Pharmacol.* **68**(1), 22-24.
- Bai F., Lau S.S. y Monks T.J. (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxymphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1150-7.
- Baldwin H.A., Colado M.I., Murray T.K., De Souza R.J. y Green A.R. (1993) Striatal dopamine release in vivo following neurotoxic doses of methamphetamine and effect of the neuroprotective drugs, chlormethiazole and dizocilpine. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 590-6.
- Bankson M.G. y Cunningham K.A. (2001) 3,4-Methylenedioxymphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 846-52.
- Bankson M.G. y Cunningham K.A. (2002) Pharmacological studies of the acute effects of (+)-3,4-methylenedioxymphetamine on locomotor activity: role of 5-HT(1B/1D) and 5-HT(2) receptors. *Neuropsychopharmacology* **26**, 40-52.
- Bankson M.G. y Yamamoto B.K. (2004) Serotonin-GABA interactions modulate MDMA-induced mesolimbic dopamine release. *J Neurochem.* **91**, 852-9.
- Bannister P., Levy L., Bolton R. y Losowsky M.S. (1988) Acute ethanol ingestion raises plasma gamma aminobutyric acid levels in healthy men. *Alcohol Alcohol* **23**, 45-8.
- Bao X., Hui D., Naassila M. y Michaelis E.K. (2001) Chronic ethanol exposure increases gene transcription of subunits of an N-methyl-D-aspartate receptor-like complex in cortical neurons in culture. *Neurosci. Lett.* **315**, 5-8.
- Battaglia G., Yeh S.Y., O'Hearn E., Molliver M.E., Kuhar M.J. y De Souza E.B. (1987) 3,4-Methylenedioxymphetamine and 3,4-methylenedioxymphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptakes sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 911-6.
- Battaglia G., Brooks B.P., Kulsakdinun C. y De Souza E.B. (1988a) Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymphetamine) at various brain recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* **149**, 159-63.
- Battaglia G., Yeh S.Y. y De Souza E.B. (1988b) MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav* **29**, 269-74.
- Battaglia G., Sharkey J., Kuhar M.J. y de Souza E.B. (1991) Neuroanatomic specificity and time course of alterations in rat brain serotonergic pathways induced by MDMA (3,4-methylenedioxymphetamine): assessment using quantitative autoradiography. *Synapse* **8**, 249-60.
- Battaglia G., Fornai F., Busteci C.L., Cerrito F., De Blasi A., Melchiorri D. y Nicoletti F. (2002) Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. *J. Neurosci.* **22**, 2135-41.
- Baumgarten H.G., Jenner S. y Klemm H.P. (1981) Serotonin neurotoxins: recent advances in the mode of administration and molecular mechanism of action. *J. Physiol. (Paris)* **77**, 309-14.
- Baydas G. y Tuzcu M. (2005) Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp. Neurol.* **194**, 175-81.
- Bedi G. y Redman J. (2006) Recreational ecstasy use: acute effects potentiated by ambient conditions? *Neuropsychobiology* **53**, 113; author reply 114.
- Bendotti C., Baldessari S., Pende M., Tarizzo G., Miari A., Presti M.L., Mennini T. Y Samanin R. (1994) Does GFAP mRNA and mitochondrial benzodiazepine receptor binding detect serotonergic neuronal degeneration in rat? *Brain Res. Bull.* **34**, 389-94.
- Benjamin D., Grant E.R. y Pohorecky L.A. (1993) Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res.* **621**, 137-40.
- Berger U.V., Gu X.F. y Azmitia E.C. (1992) The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* **215**, 153-60.

- Bergman H. (1985) Cognitive deficits and morphological cerebral changes in a random sample of social drinkers. *Recent Dev. Alcohol* **3**, 265-76.
- Betabert R. y Greenamyre J.T. (2004) Regulation of dopamine receptor and neuropeptide expression in the basal ganglia of monkeys treated with MPTP. *Exp. Neurol.* **189**, 393-403.
- Beveridge T.J., Mechan A.O., Sprakes M., Pei Q., Zetterstrom T.S., Green A.R. y Elliott J.M. (2004) Effect of 5-HT depletion by MDMA on hyperthermia and Arc mRNA induction in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 346-52.
- Blanchard B.A., Steindorf S., Wang S. y Glick S.D. (1993) Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 968-73.
- Blum K., Wallace J.E. y Friedman R.N. (1974) Reduction of acute alcoholic intoxication by alpha amino acids: glycine and serine. *Life Sci.* **14**, 557-65.
- Bobes J., Saiz P.A., Gonzalez M.P., Bascaran M.T., Bousoño M., Ricaurte G.A. y McCann U.D. (2002) Use of MDMA and other illicit drugs by young adult males in northern Spain. A five-year study. *Eur. Addict Res.* **8**, 147-54.
- Bogen I.L., Haug K.H., Myhre O. y Fonnum F. (2003) Short- and long-term effects of MDMA ("ecstasy") on synaptosomal and vesicular uptake of neurotransmitters in vitro and ex vivo. *Neurochem. Int.* **43**, 393-400.
- Bolla K.I., McCann U.D. y Ricaurte G.A. (1998) Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users. *Neurology.* **51**, 1532-7.
- Bondy S.C., Guo S.X. y Adams J.D. (1996) Prevention of ethanol-induced changes in reactive oxygen parameters by alpha-tocopherol. *Alcohol Alcohol* **31**, 403-10.
- Borges R., Fera M., Diaz E., Rodriguez Mendez S.A. y Boada J. (1986) Effect of ethanol on neuromuscular function in rats. Its interaction with alcuronium. *Gen. Pharmacol.* **17**, 569-72.
- Bouso Saiz J.C. y Gomez-Jarabo G. (2003) [Therapeutic investigation with MDMA (ecstasy)]. *Med. Clin. (Barc)* **121**, 318; author reply 318-9.
- Bowyer J.F., Young J.F., Slikker W., Itzak Y., Mayorga A.J., Newport G.D., Ali S.F., Frederick D.L. y Paule M.G. (2003) Plasma levels of parent compound and metabolites after doses of either d-fenfluramine or d-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) that produce long-term serotonergic alterations. *Neurotoxicology* **24**, 379-90.
- Boyce-Rustay J.M., Wiedholz L.M., Millstein R.A., Carroll J., Murphy D.L., Daws L.C. y Holmes A. (2006) Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **30**, 1957-65.
- Brick J. y Horowitz G.P. (1982) Alcohol and morphine induced hypothermia in mice selected for sensitivity in ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **16**, 473-9.
- Brien J.F. y Smith G.N. (1991) Effects of alcohol (ethanol) on the fetus. *J. Dev. Physiol.* **15**, 21-32.
- Brodie M.S., Shefner S.A. y Dunwiddie T.V. (1990) Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res.* **508**, 65-9.
- Brodie M.S., Pesold C. y Appel S.B. (1999) Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **23**, 1848-52.
- Brodie M.S. y Appel S.B. (2000) Dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of C57BL/6J and DBA/2J mice differ in sensitivity to ethanol excitation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **24**, 1120-4.
- Brodie M.S. (2002) Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**, 1024-30.
- Broening H.W., Bowyer J.F. y Slikker W. Jr (1995) Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 325-33.
- Brooks P.J. (1997) DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1073-82.
- Browman K.E., Rustay N.R., Nikolaidis N., Crawshaw L. y Crabbe J.C. (2000) Sensitivity and tolerance to

- ethanol in mouse lines selected for ethanol-induced hypothermia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **67**, 821-9.
- Brown C. y Osterloh J. (1987) Multiple severe complications from recreational ingestion of MDMA ('Ecstasy'). *JAMA* **258**, 780-1.
- Buchert R., Obrocki J., Thomasius R., Vaterlein O., Petersen K., Jenicke L., Bohuslavizki K.H. y Clausen M. (2001) Long-term effects of 'ecstasy' abuse on the human brain studied by FDG PET. *Nucl. Med. Commun* **22**, 889-97.
- Budygin E.A., Phillips P.E., Robinson D.L., Kennedy A.P., Gainetdinov R.R. y Wightman R.M. (2001a) Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 27-34.
- Budygin E.A., Phillips P.E., Wightman R.M. y Jones S.R. (2001b) Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. *Synapse* **42**, 77-9.
- Buhler R., Pestalozzi D., Hess M. y Von Wartburg J.P. (1983) Immunohistochemical localization of alcohol dehydrogenase in human kidney, endocrine organs and brain. *Pharmacol Biochem Behav* **18** (1), 55-9.
- Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., Quigley D.I., Darland T., Suchland K.L., Pasumamula S., Kennedy J.L., Olson S.B., Magenlis R.E., Amara S.G. y Grandy D.K. (2001) Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1181-8.
- Burrows K.B., Gudelsky G. y Yamamoto B.K. (2000) Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. *Eur. J. Pharmacol.* **398**, 11-8.
- Cadet J.L., Ladenheim B., Hirata H., Rothman R.B., Ali S., Carlson E., Epstein C. y Moran T.H. (1995) Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse* **21**, 169-76.
- Cadet J.L., Thiriet N. y Jayanthi S. (2001) Involvement of free radicals in MDMA-induced neurotoxicity in mice. *Ann. Med. Interne. (Paris)* **152** (3), IS57-9.
- Calabrese V., Scapagnini G., Latteri S., Colombrita C., Ravagna A., Catalano C., Pennisi G., Calvani M. y Butterfield D.A. (2002) Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine. *Int. J. Tissue React.* **24**, 97-104.
- Callahan B.T., Cord B.J. y Ricaurte G.A. (2001) Long-term impairment of anterograde axonal transport along fiber projections originating in the rostral raphe nuclei after treatment with fenfluramine or methylenedioxymethamphetamine. *Synapse* **40**, 113-21.
- Callaway C.W., Wing L.L. y Geyer M.A. (1990) Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**, 456-64.
- Camarero J., Sanchez V., O'Shea E., Green A.R. y Colado M.I. (2002) Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J. Neurochem.* **81**, 961-72.
- Campbell A.D. y McBride W.J. (1995) Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **51**, 835-42.
- Capela J.P., Ruscher K., Lautenschlager M., Freyer D., Dirnagl U., Gaio A.R., Bastos M.L., Meisel A. y Carvalho F. (2006a) Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. *Neuroscience* **139**, 1069-81.
- Capela J.P., Meisel A., Abreu A.R., Branco P.S., Ferreira L.M., Lobo A.M., Remiao F., Bastos M.L., y Carvalho F. (2006b) Neurotoxicity of Ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 53-61.
- Carlen P.L., Lee M.A., Jacob M. y Livshits O. (1981) Parkinsonism provoked by alcoholism. *Ann. Neurol.* **9**, 84-6.
- Carroll M.R., Rodd Z.A., Murphy J.M. y Simon J.R. (2006) Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats. *Alcohol* **40**, 103-9.
- Carvalho M., Carvalho F., Remiao F., de Lourdes Pereira M., Pires-das-Neves R. y de Lourdes Bastos M. (2002)

- Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch. Toxicol.* **76**, 166-72.
- Cebers G., Cebere A., Zharkovsky A. y Liljequist S. (1996) Glycine does not reverse the inhibitory actions of ethanol on NMDA receptor functions in cerebellar granule cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **354**, 736-45.
- Chandler L.J., Sumners C. y Crews F.T. (1993) Ethanol inhibits NMDA receptor-mediated excitotoxicity in rat primary neuronal cultures. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 54-60.
- Chandler L.J., Norwood D. y Sutton G. (1999) Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **23**, 363-70.
- Chang L., Ernst T., Grob C.S. y Poland R.E. (1999) Cerebral (1)H MRS alterations in recreational 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users. *J. Magn. Reson. Imaging* **10**, 521-6.
- Chang L., Grob C.S., Ernst T., Itti L., Mishkin F.S., Jose-Melchor R. y Poland R.E. (2000) Effect of ecstasy. *Psychiatry Res.* **98**, 15-28.
- Chang G.Q., Karatayev O., Ahsan R., Avena N.M., Lee C., Lewis M.J., Hoebel B.G. y Leibowitz S.F. (2007) Effect of ethanol on hypothalamic opioid peptides, enkephalin, and dynorphin: relationship with circulating triglycerides. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 249-59.
- Charness M.E., Gordon A.S. y Diamond I. (1983) Ethanol modulation of opiate receptors in cultured neural cells. *Science* **222**, 1246-8.
- Charness M.E. (1993) Brain lesions in alcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 2-11.
- Che S., Johnson M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1995) Body temperature effect on methylenedioxymethamphetamine-induced acute decrease in tryptophan hydroxylase activity. *Eur. J. Pharmacol.* **293**, 447-53.
- Coffman J.A. y Petty F. (1985) Plasma GABA levels in chronic alcoholics. *Am. J. Psychiatry* **142**, 1204-5.
- Cohen C., Perrault G. y Sanger D.J. (1997) Evidence for the involvement of dopamine receptors in ethanol-induced hyperactivity in mice. *Neuropharmacology* **36**, 1099-108.
- Cohn T.J., Foster J.H. y Peters T.J. (2003) Sequential studies of sleep disturbance and quality of life in abstaining alcoholics. *Addict Biol.* **8**, 455-62.
- Colado M.I., Murray T.K. y Green A.R. (1993) 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 583-9.
- Colado M.I. y Green A.R. (1994) A study of the mechanism of MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 131-6.
- Colado M.I. y Green A.R. (1995) The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur. J. Pharmacol.* **280**, 343-6.
- Colado M.I., Williams J.L. y Green A.R. (1995) The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 1281-9.
- Colado M.I., O'Shea E., Granados R., Misra A., Murray T.K. y Green A.R. (1997a) A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 827-33.
- Colado M.I., O'Shea E., Granados R., Murray T.K. y Green A.R. (1997b) In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 889-900.
- Colado M.I., Granados R., O'Shea E., Esteban B. y Green A.R. (1998) Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ('ecstasy')-induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 479-84.
- Colado M.I., Esteban B., O'Shea E., Granados R. y Green A.R. (1999a) Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration. *Psychopharmacology (Berl)* **142**, 421-5.

- Colado M.I., O'Shea E., Esteban B., Granados R. y Green A.R. (1999b) In vivo evidence against clomethiazole being neuroprotective against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of rat brain 5-HT nerve terminals by a free radical scavenging mechanism. *Neuropharmacology* **38**, 307-14.
- Colado M.I., O'Shea E., Granados R., Esteban B., Martin A.B. y Green A.R. (1999c) Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 911-24.
- Colado M.I., Camarero J., Mehan A.O., Sanchez V., Esteban B., Elliott J.M. y Green A.R. (2001a) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1711-23.
- Colado M.I., O'Shea E., Esteban B. y Green A.R. (2001b) Studies on the neuroprotective effect of the enantiomers of AR-A008055, a compound structurally related to clomethiazole, on MDMA ("ecstasy")-induced neurodegeneration in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* **157**, 82-8.
- Colado M.I., O'Shea E. y Green A.R. (2004) Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 249-63.
- Collins M.A., Corso T.D. y Neafsey E.J. (1996) Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol clin. Exp. Res.* **20**, 284-92.
- Commins D.L., Vosmer G., Virus R.M., Woolverton W.L., Schuster C.R. y Seiden L.S. (1987) Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**, 338-45.
- Compan V., Searce-Levie K., Crosson C., Daszuta A. y Hen R. (2003) Enkephalin contributes to the locomotor stimulating effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 383-90.
- Connor T.J., McNamara M.G., Finn D., Currid A., O'Malley M., Redmond A.M., Kelly J.P. y Leonard B.E. (1998) Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. *Immunopharmacology* **38**, 253-60.
- Correa M., Arizzi M.N., Betz A., Mingote S. y Salamone J.D. (2003) Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology (Berl)* **170**, 368-75.
- Cowen M., Chen F., Jarrott B. y Lawrence A.J. (1998) Effects of acute ethanol on GABA release and GABA(A) receptor density in the rat mesolimbic system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**, 51-7.
- Cox B.J., Norton G.R., Swinson R.P. y Endler N.S. (1990) Substance abuse and panic-related anxiety: a critical review. *Behav. Res. Ther.* **28**, 385-93.
- Crabbe J.C., Rigter H., Uijlen J. y Strijbos C. (1979) Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 128-33.
- Crabbe J.C. (1994) Tolerance to ethanol hypothermia in HOT and COLD mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **18**, 42-6.
- Crawford C.A., Williams M.T., Kohutek J.L., Choi F.Y., Yoshida S.T., McDougall S.A. y Vorhees C.V. (2006) Neonatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) exposure alters neuronal protein kinase A activity, serotonin and dopamine content. *Brain Res.* **1077**, 178-86.
- Crawley J. y Goodwin F.K. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **13**, 167-70.
- Crawshaw L.I., Wallace H.L., Christensen R. y Crabbe J.C. (2001) Influence of ethanol on thermoregulation: mapping quantitative trait loci. *Physiol. Genomics.* **7**, 159-69.
- Crean R.D., Davis S.A., Von Huben S.N., Lay C.C., Katner S.N. y Taffe M.A. (2006) Effects of (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine, (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine and methamphetamine on temperature and activity in rhesus macaques. *Neuroscience* **142**, 515-25.
- Creighton F.J., Black D.L. y Hyde C.E. (1991) 'Ecstasy' psychosis and flashbacks. *Br. J. Psychiatry* **159**, 713-5.
- Crespi D., Mennini T. y Gobbi M. (1997) Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-

- fenfluramine. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1735-43.
- Crews F., Nixon K., Kim D., Joseph J., Shukitt-Hale B., Qin L. y Zou J. (2006) BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **30**, 1938-49.
- Criswell H.E., Simson P.E., Duncan G.E., McCown T.J., Herbert J.S., Morrow A.L. y Breese G.R. (1993) Molecular basis for regionally specific action of ethanol on gamma-aminobutyric acidA receptors: generalization to other ligand-gated ion channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 522-37.
- Dafters R.I. (1994) Effect of ambient temperature on hyperthermia and hyperkinesia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **114**, 505-8.
- Dafters R.I. (1995) Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. *Physiol. Behav.* **58**, 877-82.
- Dafters R.I. y Lynch E. (1998) Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy") but not by fenfluramine. *Psychopharmacology (Berl)* **138**, 207-12.
- Dahchour A., Quertemont E. y De Witte P. (1994) Acute ethanol increases taurine but neither glutamate nor GABA in the nucleus accumbens of male rats: a microdialysis study. *Alcohol Alcohol* **29**, 485-7.
- Dahchour A. y De Witte P. (2003a) Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* **459**, 171-8.
- Dahchour A. y De Witte P. (2003b) Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 465-70.
- Dahchour A., Lallemand F., Ward R.J. y De Witte P. (2005) Production of reactive oxygen species following acute ethanol or acetaldehyde and its reduction by acamprosate in chronically alcoholized rats. *Eur. J. Pharmacol.* **520**, 51-8.
- Darvesh A.S., Shankaran M. y Gudelsky G.A. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine produces glycogenolysis and increases the extracellular concentration of glucose in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 138-44.
- Darvesh A.S. y Gudelsky G.A. (2005) Evidence for a role of energy dysregulation in the MDMA-induced depletion of brain 5-HT. *Brain Res.* **1056**, 168-75.
- Darvesh A.S., Yamamoto B.K. y Gudelsky G.A. (2005) Evidence for the involvement of nitric oxide in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletion in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 694-701.
- Dave J.R., Karanian J.W. y Eskay R.L. (1986) Chronic ethanol treatment decreases specific nonopioid beta-endorphin binding to hepatic and kidney membranes and lowers plasma beta-endorphin in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**, 161-6.
- De Freitas V., da Silva Porto P., Assuncao M., Cadete-Leite A., Andrade J.P. y Paula-Barbosa M.M. (2004) Flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal lipofuscin formation. *Alcohol Alcohol* **39**, 303-11.
- De Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martínez L. y Joseph-Bravo P. (2000) Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem. Int.* **37**, 483-96.
- De la Torre R. y Farre M. (2004) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 505-8.
- De Souza I., Kelly J.P., Harkin A.J. y Leonard B.E. (1997) An appraisal of the pharmacological and toxicological effects of a single oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the rat. *Pharmacol. Toxicol.* **80**, 207-10.
- Deitrich R.A., Troxell P.A. y Worth W.S. (1976) Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2733-7.
- Diana M., Gessa G.L. y Rossetti Z.L. (1992) Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system. *Alcohol Alcohol* **27**, 329-33.

- Diana M., Pistis M., Muntoni A.L. y Gessa G.L. (1995) Ethanol withdrawal does not induce a reduction in the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the mesolimbic system. *Brain Res.* **682**, 29-34.
- Diaz L.M. y Gonzales R.A. (2002) Quantifying acetaldehyde in the nucleus accumbens after ethanol injection using microdialysis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**, 874.
- Doblin R. (2002) A clinical plan for MDMA (Ecstasy) in the treatment of posttraumatic stress disorder (PTSD): partnering with the FDA. *J. Psychoactive Drugs* **34**, 185-94.
- Doyle K.M., Bird D.A., al-Salihi S., Hallag Y., Cluette-Brown J.E., Goss K.A. y Laposata M. (1994) Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J. Lipid Res.* **35**, 428-37.
- Dragunow M., Logan B. y Lavery R. (1991) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces Fos-like proteins in rat basal ganglia: reversal with MK 801. *Eur. J. Pharmacol.* **206**, 255-8.
- Dyr W., McBride W.J., Lumeng L., Li T.K. y Murphy J.M. (1993) Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol-drinking (HAD) line of rats. *Alcohol* **10**, 207-12.
- Egan C.T., Herrick-Davis K., Millar K., Glennon R.A. y Teitler M. (1998) Agonist activity of LSD and lisuride at cloned 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **136**, 409-14.
- Ehrig T., Bosron W.F. y Li T.K. (1990) Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol* **25**, 105-16.
- El-Sokkary G.H., Reiter R.J., Tan D.X., Kim S.J. y Cabrera J. (1999) Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol Alcohol* **34**, 842-50.
- Erdtmann-Vourliotis M., Mayer P., Riechert U. y Holtt V. (1999) Acute injection of drugs with low addictive potential (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diamide) causes a much higher c-fos expression in limbic brain areas than highly addicting drugs (cocaine and morphine). *Brain Res. Mol. Brain Res.* **71**, 313-24.
- Eriksson C.J. (2001) The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin. Exp. Res.* **25**, 15-32.
- Escobedo I., O'Shea E., Orio L., Sanchez V., Segura M., de la Torre R., Farre M., Green A.R. y Colado M.I. (2005) A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 231-41.
- Esteban B., O'Shea E., Camarero J., Sanchez V., Green A.R. y Colado M.I. (2001) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Berl)* **154**, 251-60.
- Eysseric H., Gonthier B., Soubeyran A., Bessard G., Saxod R. y Barret L. (1997) Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1018-23.
- Eysseric H., Gonthier B., Soubeyran A., Richard M.J., Daveloose D. y Barret L. (2000) Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* **21**, 117-25.
- Fadda F., Argiolas A., Melis M.R., Serra G. y Gessa G.L. (1980) Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* **27**, 979-86.
- Fadda F. y Rossetti Z.L. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* **56**, 385-431.
- Fadda P., Tronci S., Colombo G. y Fratta W. (1999) Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **23**, 1296-305.
- Falk E.M., Cook V.J., Nichols D.E. y Sprague J.E. (2002) An antisense oligonucleotide targeted at MAO-B attenuates rat striatal serotonergic neurotoxicity induced by MDMA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**, 617-22.
- Fallon J.H. y Moore R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.* **180**, 545-80.
- Farfel G.M., Vosmer G.L. y Seiden L.S. (1992) The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801 protects against

- serotonin depletions induced by methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. *Brain Res.* **595**, 121-7.
- Farfel G.M. y Seiden L.S. (1995) Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. I. Experiments using 3,4-methylenedioxymethamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 860-7.
- Feller D.J., Young E.R., Riggan J.P., Stuart J. y Crabbe J.C. (1993) Serotonin and genetic differences in sensitivity and tolerance to ethanol hypothermia. *Psychopharmacology (Berl)* **112**, 331-8.
- Ferko A.P. y Bobyock E. (1977) Induction of physical dependence in rats by ethanol inhalation without the use of pyrazole. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **40**, 269-76.
- Fibiger H.C. y Phillips A.G. (1974) Role of dopamine and norepinephrine in the chemistry of reward. *J. Psy. Chiat. Res.* **11**, 135-43.
- Finnegan K.T., Ricaurte G.A., Ritchie L.D., Irwin I., Peroutka S.J. y Langston J.W. (1988) Orally administered MDMA causes a long-term depletion of serotonin in rat brain. *Brain Res.* **447**, 141-4.
- Fischer C., Hatzidimitriou G., Wlos J., Katz J. y Ricaurte G. (1995) Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J. Neurosci.* **15**, 5476-85.
- Fischer H.S., Zernig G., Schatz D.S., Humpel C. y Saria A. (2000) MDMA ('ecstasy') enhances basal acetylcholine release in brain slices of the rat striatum. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1385-90.
- Fitzgerald J.L. y Reid J.J. (1990) Effects of methylenedioxymethamphetamine on the release of monoamines from rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* **191**, 217-20.
- Floyd R.A., Watson J.J. y Wong P.K. (1984) Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 221-35.
- Follesa P. y Ticku M.K. (1995) Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **29**, 99-106.
- Follesa P. y Ticku M.K. (1996) Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J. Biol. Chem.* **271**, 13297-9.
- Fornai F., Giorgi F.S., Gesi M., Chen K., Alessri M.G. y Shih J.C. (2001) Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse* **39**, 213-21.
- Fornai F., Lazzeri G., Lenzi P., Gesi M., Ferrucci M., Soldani P., Pellegrini A., Capobianco L., De Blasi A., Ruggieri S. y Paparelli A. (2003) Amphetamines induce ubiquitin-positive inclusions within striatal cells. *Neurol. Sci.* **24**, 182-3.
- Fox H.C., Parrott A.C. y Turner J.J. (2001) Ecstasy use: cognitive deficits related to dosage rather than self-reported problematic use of the drug. *J. Psychopharmacol.* **15**, 273-81.
- Franklin K.B.J. y Paxinos G. (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, Inc.*, San Diego, CA.
- Freeman B.A. y Crapo J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412-26.
- Freund G. (1973) Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Annu. Rev. Pharmacol.* **13**, 217-27.
- Freund R.K., van Horne C.G., Harlan T. y Palmer M.R. (1993) Electrophysiological interactions of ethanol with GABAergic mechanisms in the rat cerebellum in vivo. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 321-8.
- Fukumori R., Minegishi A., Satoh T., Kitagawa H. y Yanaura S. (1980) Changes in the serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid contents in rat brain after ethanol and disulfiram treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **61**, 199-202.
- Galineau L., Belzung C., Kodas E., Bodard S., Guilloteau D. y Chalon S. (2005) Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) exposure induces long-term alterations in the dopaminergic and serotonergic functions in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **154**, 165-76.
- Gallaher E.J. y Egner D.A. (1987) Rebound hyperthermia follows ethanol-induced hypothermia in rats.

- Psychopharmacology (Berl)* **91**, 34-39.
- Gamella J.F. y Roldán A.A. (1997) Drogas de síntesis en España. Patrones y tendencias de adquisición y consumo. *Delegación del Gobierno para Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio del Interior. Editorial Doce Calles, S.L.*
- Gamma A., Buck A., Berthold T., Liechti M.E. y Vollenweider F.X. (2000) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) modulates cortical and limbic brain activity as measured by. *Neuropsychopharmacology* **23**, 388-95.
- Gatto G.J., McBride W.J., Murphy J.M., Lumeng L. y Li T.K. (1994) Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* **11**, 557-64.
- Gerra G., Zaimovic A., Giucastro G., Maestri D., Monica C., Sartori R., Caccavari R. y Delsignore R. (1998) Serotonergic function after (+/-)3,4-methylene-dioxymethamphetamine ("Ecstasy") in humans. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **13**, 1-9.
- Gessa G.L., Muntoni F., Collu M., Vargiu L. y Mereu G. (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* **348**, 201-3.
- Gianoulakis C. y Barcomb A. (1987) Effect of acute ethanol in vivo and in vitro on the beta-endorphin system in the rat. *Life Sci.* **40**, 19-28.
- Gianoulakis C., Hutchison W.D. y Kalant H. (1988) Effects of ethanol treatment and withdrawal on biosynthesis and processing of proopiomelanocortin by the rat neurointermediate lobe. *Endocrinology* **122**, 817-25.
- Gil-Martin E., Colado I., Fernandez-Lopez A., Fernandez-Briera A. y Calvo P. (1996) Effects of an acute dose of ethanol on dopaminergic and serotonergic systems from rat cerebral cortex and striatum. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **113**, 399-402.
- Gill K., Menez J.F., Lucas D. y Deitrich R.A. (1992) Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**, 910-5.
- Giri P.R., Linnoila M., O'Neill J.B. y Goldman D. (1989) Distribution and possible metabolic role of class III alcohol dehydrogenase in the human brain. *Brain Res.* **481**, 131-41.
- Goldstein D.B. (1975) Physical dependence in alcohol in mice. *Fed. Proc.* **34**, 1953-61.
- Gollamudi R., Ali S.F., Lipe G., Newport G., Webb P., Lopez M., Leahey J.E., Kolta M. y Slikker W. Jr (1989) Influence of inducers and inhibitors on the metabolism in vitro and neurochemical effects in vivo of MDMA. *Neurotoxicology* **10**, 455-66.
- Gonthier B., Jeunet A. y Barret L. (1991) Electron spin resonance study of free radicals produced from ethanol and acetaldehyde after exposure to a Fenton system or to brain and liver microsomes. *Alcohol* **8**, 369-75.
- Gonzales R.A. y Hoffman P.L. (1991) Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 1-3.
- Gonzales R.A., Job M.O. y Doyon W.M. (2004) The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol. Ther.* **103**, 121-46.
- Gordon C.J. y Mohler F.S. (1990) Thermoregulation at a high ambient temperature following the oral administration of ethanol in the rat. *Alcohol* **7**, 551-5.
- Gordon C.J., Watkinson W.P., O'Callaghan J.P. y Miller D.B. (1991) Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 339-44.
- Gordon C.J. y Fogelson L. (1994) Metabolic and thermoregulatory responses of the rat maintained in acrylic or wire-screen cages: implications for pharmacological studies. *Physiol. Behav.* **56**, 73-9.
- Gothoni P. y Ahtee L. (1980) Chronic ethanol administration decreases 5-HT and increases 5-HIAA concentration in rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* **46**, 113-20.
- Gough B., Ali S.F., Slikker W. Jr. y Holson R.R. (1991) Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**, 619-23.
- Grahame-Smith D.G. (1971b) Inhibitory effect of chlorpromazine on the syndrome of hiperactivity produced by L-

- tryptophan or 5-methoxy-N,N-Dimethyltryptamine in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **43**, 856-64.
- Grahame N.J., Rodd-Henricks K., Li T.K. y Lumeng L. (2000) Ethanol locomotor sensitization, but not tolerance correlates with selection for alcohol preference in high- and low-alcohol preferring mice. *Psychopharmacology (Berl)* **151**, 252-60.
- Grant R.T. (1963) Vasodilation and body warming in the rat. *J. Physiol.* **167**, 311-17.
- Grant K.A., Valverius P., Hudspeth M. y Tabakoff B. (1990) Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.* **176**, 289-96.
- Green A.R., De Souza R.J., Williams J.L., Murray T.K. y Cross A.J. (1992) The neurotoxic effects of methamphetamine on 5-hydroxytryptamine and dopamine in brain: evidence for the protective effect of chlormethiazole. *Neuropharmacology* **31**, 315-21.
- Green A.R., Cross A.J. y Goodwin G.M. (1995) Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* **119**, 247-60.
- Green A.R., Mehan A.O., Elliott J.M., O'Shea E. y Colado M.I. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* **55**, 463-508.
- Green A.R., O'Shea E. y Colado M.I. (2004) A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 3-13.
- Greer G. y Strassman R.J. (1985) Information on "Ecstasy". *Am. J. Psychiatry* **142**, 1391.
- Grover P.M. y Linder J.C. (1983) Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: descriptions based on analysis of serial sections. *Exp. Brain Res.* **49**, 209-17.
- Gu X.F. y Azmitia E.C. (1993) Integrative transporter-mediated release from cytoplasmic and vesicular 5-hydroxytryptamine stores in cultured neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **235**, 51-7.
- Gudelsky G.A., Yamamoto B.K. y Nash J.F. (1994) Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT₂ receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* **264**, 325-30.
- Gudelsky G.A. (1996) Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin. *J. Neural. Transm.* **103**, 1397-404.
- Gudelsky G.A. y Nash J.F. (1996) Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J. Neurochem.* **66**, 243-9.
- Gulya K., Grant K.A., Valverius P., Hoffman P.L. y Tabakoff B. (1991) Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res.* **547**, 129-34.
- Halliwell B., Kaur H. y Ingelman-Sundberg M. (1991) Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxy radicals: a cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.* **10**, 439-41.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147-50.
- Hamby-Mason R., Chen J.J., Schenker S., Perez A. y Henderson G.I. (1997) Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1063-72.
- Hamelink C., Hampson A., Wink D.A., Eiden L.E. y Eskay R.L. (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 780-8.
- Hansen J.P., Riddle E.L., Sandoval V., Brown J.M., Gibb J.W., Hanson G.R. y Fleckenstein A.E. (2002) Methylenedioxymethamphetamine decreases plasmalemmal and vesicular dopamine transport: mechanisms and implications for neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 1093-100.
- Harding A.J., Halliday G.M., Ng J.L., Harper C.G. y Kril J.J. (1996) Loss of vasopressin-immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. *Neuroscience* **72**, 699-708.
- Hargreaves G.A., Hunt G.E., Cornish J.L. y McGregor I.S. (2007) High ambient temperature increases 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy")-induced Fos expression in a region-specific manner. *Neuroscience* **145**, 764-74.

- Harper C. y Corbett D. (1990) Changes in the basal dendrites of cortical pyramidal cells from alcoholic patients--a quantitative Golgi study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **53**, 856-61.
- Harper C. y Kril J. (1994) An introduction to alcohol-induced brain damage and its causes. *Alcohol Alcohol Suppl.* **2**, 237-43.
- Harris R.A., Proctor W.R., McQuilkin S.J., Klein R.L., Mascia M.P., Whatley V., Whiting P.J. y Dunwiddie T.V. (1995a) Ethanol increases GABAA responses in cells stably transfected with receptor subunits. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **19**, 226-32.
- Harris R.A., McQuilkin S.J., Paylor R., Abeliovich A., Tonegawa S. y Wehner J.M. (1995b) Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 3658-62.
- Harris D.S., Baggott M., Mendelson J.H., Mendelson J.E. y Jones R.T. (2002) Subjective and hormonal effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. *Psychopharmacology (Berl)* **162**, 396-405.
- Harris B.R., Gibson D.A., Prendergast M.A., Blanchard J.A., Holley R.C., Hart S.R., Scotland R.L., Foster T.C., Pedigo N.W. y Littleton J.M. (2003) The neurotoxicity induced by ethanol withdrawal in mature organotypic hippocampal slices might involve cross-talk between metabotropic glutamate type 5 receptors and N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 1724-35.
- Hashimoto K., Tomitaka S-H, Narita N, Minabe Y. Y Iyo M. (1997) Induction of Fos protein by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in rat brain: regional differences in pharmacological manipulation. *Addiction Biol.* **2**, 317-26.
- Hatzidimitriou G., McCann U.D. y Ricaurte G.A. (1999) Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *J. Neurosci.* **19**, 5096-107.
- Hayase T., Yamamoto Y. y Yamamoto K. (2005) Persistent anxiogenic effects of a single or repeated doses of cocaine and methamphetamine: interactions with endogenous cannabinoid receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* **16**, 395-404.
- Heffernan T.M., Ling J. y Scholey A.B. (2001) Subjective ratings of prospective memory deficits in MDMA ('ecstasy') users. *Hum. Psychopharmacol.* **16**, 339-44.
- Heidbreder C. y De Witte P. (1993) Ethanol differentially affects extracellular monoamines and GABA in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**, 477-81.
- Heikikila R.E., Cabbat F.S. y Mytilineou C. (1977) Studies on the capacity of mazindol and dita to act as uptake inhibitors or releasing agents for 3H-biogenic amines in rat brain tissue slices. *Eur. J. Pharmacol.* **45**, 329-33.
- Heinz A., Jones D.W., Bissette G., Hommer D., Ragan P., Knable M., Wellek S., Linnoila M. y Weinberger D.R. (2002) Relationship between cortisol and serotonin metabolites and transporters in alcoholism. *Pharmacopsychiatry* **35**, 127-34.
- Herin D.V., Liu S., Ullrich T., Rice K.C. y Cunningham K.A. (2005) Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the hyperlocomotive and hyperthermic effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **178**, 505-13.
- Hewitt K.E. y Green A.R. (1994) Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ('Ecstasy') to rats. *Neuropharmacology* **33**, 1589-95.
- Hiller J.M., Angel L.M. y Simon E.J. (1984) Characterization of the selective inhibition of the delta subclass of opioid binding sites by alcohols. *Mol. Pharmacol.* **25**, 249-55.
- Hiramatsu M., Kumagai Y., Unger S.E. y Cho A.K. (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**, 521-7.
- Hodge C.W., Samson H.H. y Chappelle A.M. (1997) Alcohol self-administration: further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1083-91.
- Hoffman P.L., Rabe C.S., Moses F. y Tabakoff B. (1989) N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition

- of calcium flux and cyclic GMP production. *J. Neurochem.* **52**, 1937-40.
- Hoffman P.L. (1995) Glutamate receptors in alcohol withdrawal-induced neurotoxicity. *Metab. Brain Dis.* **10**, 73-9.
- Hoffman P.L., Iorio K.R., Snell L.D. y Tabakoff B. (1995) Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **19**, 721-6.
- Holland J. (1999) Positron emission tomography findings in heavy users of MDMA. *Lancet* **353**, 592-3.
- Hrometz S.L., Brown A.W., Nichols D.E. y Sprague J.E. (2004) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated production of hydrogen peroxide in an in vitro model: the role of dopamine, the serotonin-reuptake transporter, and monoamine oxidase-B. *Neurosci. Lett.* **367**, 56-9.
- Huang M., Liu W., Li Q. y Wu C.F. (2002) Endogenous released ascorbic acid suppresses ethanol-induced hydroxyl radical production in rat striatum. *Brain Res.* **944**, 90-6.
- Hunt W.A. (1996) Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain--a review. *Alcohol* **13**, 147-51.
- Ikegami Y., Goodenough S., Inoue Y., Dodd P.R., Wilce P.A. y Matsumoto I. (2003) Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci. Lett.* **349**, 201-5.
- Ikonomidou C., Bittigau P., Ishimaru M.J., Wozniak D.F., Koch C., Genz K., Price M.T., Stefovská V., Horster F., Tenkova T., Dikranian K. y Olney J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* **287**, 1056-60.
- Imperato A. y Di Chiara G. (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**, 219-28.
- Insel T.R., Battaglia G., Johannessen J.N., Marra S. y De Souza E.B. (1989) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**, 713-20.
- Iorio K.R., Reinlib L., Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1992) Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. *Mol. Pharmacol.* **41**, 1142-8.
- Irvine R.J., Keane M., Felgate P., McCann U.D., Callaghan P.D. y White J.M. (2006) Plasma drug concentrations and physiological measures in 'dance party' participants. *Neuropsychopharmacology* **31**, 424-30.
- Itzhak Y. y Ali S.F. (1996) The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *J. Neurochem.* **67**, 1770-3.
- Itzhak Y., Ali S.F., Achat C.N. y Anderson K.L. (2003) Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **166**, 241-8.
- Jayanthi S., Ladenheim B., Andrews A.M. y Cadet J.L. (1999) Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Neuroscience* **91**, 1379-87.
- Jennett R.B., Sorrell M.F., Saffari-Fard A., Ockner J.L. y Tuma D.J. (1989) Preferential covalent binding of acetaldehyde to the alpha-chain of purified rat liver tubulin. *Hepatology* **9**, 57-62.
- Johnsen-Soriano S., Bosch-Morell F., Miranda M., Asensio S., Barcia J.M., Roma J., Monfort P., Felipe V. y Romero F.J. (2007) Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 486-92.
- Johnson M.P., Hoffman A.J. y Nichols D.E. (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on. *Eur. J. Pharmacol.* **132**, 269-76.
- Johnson M., Letter A.A., Merchant K., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1988) Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine isomers on central serotonergic, dopaminergic and nigral neurotensin systems of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 977-82.
- Johnson M.P., Conarty P.F. y Nichols D.E. (1991) [3H]monoamine releasing and uptake inhibition properties of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **200**, 9-16.
- Johnson M., Mitros K., Stone D.M., Zobrist R., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1992) Effect of flunarizine and nimodipine on the decrease in tryptophan hydroxylase activity induced by methamphetamine and 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 586-91.
- Johnson E.A., Sharp D.S. y Miller D.B. (2000) Restraint as a stressor in mice: against the dopaminergic neurotoxicity of D-MDMA, low body weight mitigates restraint-induced hypothermia and consequent neuroprotection. *Brain Res.* **875**, 107-18.
- Johnson E.A., O'Callaghan J.P. y Miller D.B. (2002a) Chronic treatment with supraphysiological levels of corticosterone enhances D-MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the C57BL/6J female mouse. *Brain Res.* **933**, 130-8.
- Johnson E.A., Shvedova A.A., Kisin E., O'Callaghan J.P., Kommineni C. y Miller D.B. (2002) d-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. *Brain Res.* **933**, 150-63.
- Jones D.C., Duvauchelle C., Ikegami A., Olsen C.M., Lau S.S., de la Torre R. y Monks T.J. (2005) Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 422-31.
- Jones S.R., Mathews T.A. y Budygin E.A. (2006) Effect of moderate ethanol dose on dopamine uptake in rat nucleus accumbens in vivo. *Synapse* **60**, 251-5.
- Kalant H. y Le A.D. (1983) Effects of ethanol on thermoregulation. *Pharmacol. Ther.* **23**, 313-64.
- Kalant H. (2001) The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ* **165**, 917-28.
- Kalluri H.S., Mehta A.K. y Ticku M.K. (1998) Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **58**, 221-4.
- Kampov-Polevoy A.B., Matthews D.B., Gause L., Morrow A.L. y Overstreet D.H. (2000) P rats develop physical dependence on alcohol via voluntary drinking: changes in seizure thresholds, anxiety, and patterns of alcohol drinking. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **24**, 278-84.
- Kanthasamy A., Sprague J.E., Shotwell J.R. y Nichols D.E. (2002) Unilateral infusion of a dopamine transporter antisense into the substantia nigra protects against MDMA-induced serotonergic deficits in the ipsilateral striatum. *Neuroscience* **114**, 917-24.
- Kaushik S. y Kaur J. (2003) Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin. Chim. Acta.* **333**, 69-77.
- Kehne J.H., Ketteler H.J., McCloskey T.C., Sullivan C.K., Dudley M.W. y Schmidt C.J. (1996) Effects of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist MDL 100,907 on MDMA-induced locomotor stimulation in rats. *Neuropsychopharmacology* **15**, 116-24.
- Kelly P.H., Servou P.W. y Iversen S.D. (1975) Amphetamine y apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* **94**, 507-22.
- Kelly P.A., Ritchie I.M., Quate L., McBean D.E. y Olverman H.J. (2002) Functional consequences of perinatal exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 963-70.
- Kerr J.T., Maxwell D.S. y Crabb D.W. (1989) Immunocytochemistry of alcohol dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **13**, 730-6.
- Khatib S.A., Murphy J.M. y McBride W.J. (1988) Biochemical evidence for activation of specific monoamine pathways by ethanol. *Alcohol* **5**, 295-9.
- Kiianmaa K., Nurmi M., Nykänen I. y Sinclair J.D. (1995) Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**, 29-34.
- Kinoshita A., Noda M. y Kinoshita M. (2000) Differential localization of septins in the mouse. *Brain J. Comp. Neurol.* **428**, 223-39.
- Kinoshita H., Jessop D.S., Roberts D.J., Ameno K., Ijiri I., Hishida S. y Harbuz M.S. (2002) Effects of acetaldehyde on c-fos mRNA induction in the paraventricular nucleus following ethanol administration. *Alcohol Alcohol* **37**, 432-5.
- Kish S.J., Furukawa Y., Ang L., Vorce S.P. y Kalasinsky K.S. (2000) Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user. *Neurology* **55**, 294-6.
- Kleven M.S., Woolverton W.L. y Seiden L.S. (1989) Evidence that both intragastric and subcutaneous

- administration of methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) produce serotonin neurotoxicity in rhesus monkeys. *Brain Res.* **488**, 121-5.
- Koch S. y Galloway M.P. (1997) MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J. Neural. Transm.* **104**, 135-46.
- König J.F.R. y Klippel R.A. (1963) The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Robert E., Krieger, New York.
- Koprich J.B., Chen E.Y., Kanaan N.M., Campbell N.G., Kordower J.H. y Lipton J.W. (2003) Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters exploratory behavior, reduces monoamine metabolism, and increases forebrain tyrosine hydroxylase fiber density of juvenile rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **25**, 509-17.
- Kozutsumi D., Arita M., Kawashima A., Adachi M. y Takami M. (2002) An improved method for acetaldehyde determination in blood by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *J. Chromatog. Sci.* **40**, 477-82.
- Kramer H.K., Poblete J.C. y Azmitia E.C. (1995) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') promotes the translocation of protein kinase C (PKC): requirement of viable serotonin nerve terminals. *Brain Res.* **680**, 1-8.
- Krystal J.H., Price L.H., Opsahl C., Ricaurte G.A. y Heninger G.R. (1992) Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) use: effects on mood and neuropsychological function? *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **18**, 331-41.
- Ku B.M., Joo Y., Mun J., Roh G.S., Kang S.S., Cho G.J., Choi W.S. y Kim H.J. (2006) Heme oxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* **405**, 168-71.
- Kuhn D.M. y Arthur R.E., Jr. (1999) L-DOPA-quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redox-cycling quinoprotein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **73**, 78-84.
- Kumral A., Tugyan K., Gonenc S., Genc K., Genc S., Sonmez U., Yilmaz O., Duman N., Uysal N. y Ozkan H. (2005) Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **160**, 146-56.
- Lafuente M.A., Melgar M.J., Veira J.A. y Aldegunde M.A. (1992) Effects of acute ethanol administration on regional serotonin turnover. *Vet. Hum. Toxicol.* **34**, 504-7.
- Lancaster F.E. (1992) Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**, 539-41.
- Lancaster F.E. (1995) Alcohol and the brain: what's NO got to do with it? *Metab. Brain. Dis.* **10**, 125-33.
- LeBlanc A.E. y Kalant H. (1973) Central nervous system interaction of pyrazole and ethanol in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **51**, 612-5.
- Lee Y.K., Park S.W., Kim Y.K., Kim D.J., Jeong J., Myrick H. y Kim Y.H. (2005) Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol* **40**, 297-301.
- Leonardi E.T. y Azmitia E.C. (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* **10**, 231-8.
- Lessov C.N., Palmer A.A., Quick E.A. y Phillips T.J. (2001) Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 91-9.
- Lessov C.N. y Phillips T.J. (2003) Cross-sensitization between the locomotor stimulant effect of ethanol and those of morphine and cocaine in mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 616-27.
- Lew R., Sabol K.E., Chou C., Vosmer G.L., Richards J. y Seiden L.S. (1996) Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part II: Radioligand binding and autoradiography studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 855-65.
- Lewis S.R., Ahmed S., Dym C., Khaimova E., Kest B. y Bodnar R.J. (2005) Inbred mouse strain survey of sucrose intake. *Physiol. Behav.* **85**, 546-56.
- Li X.W., Li T.K. y Froehlich J.C. (1998) Enhanced sensitivity of the nucleus accumbens proenkephalin system to alcohol in rats selectively bred for alcohol preference. *Brain Res.* **794**, 35-47.

- Lieber C.S., DeCarli L.M., Feinman L., Hasumura Y., Korsten M., Matsuzaki S. y Teschke R. (1975) Effect of chronic alcohol consumption on ethanol and acetaldehyde metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **59**, 185-227.
- Lieber C.S. (1977) The metabolic basis of alcohol's toxicity. *Hosp. Pract.* **12**, 73-80.
- Liechti M.E. y Vollenweider F.X. (2000a) Acute psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after haloperidol pretreatment in healthy humans. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **10**, 289-95.
- Liechti M.E. y Vollenweider F.X. (2000b) The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') in healthy volunteers. *J. Psychopharmacol.* **14**, 269-74.
- Lim H.K. y Foltz R.L. (1988) In vivo and in vitro metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification of metabolites using an ion trap detector. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 370-8.
- Lim H.K. y Foltz R.L. (1991a) In vivo formation of aromatic hydroxylated metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification by ion trap tandem mass spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) techniques. *Biol. Mass. Spectrom.* **20**, 677-86.
- Lim H.K. y Foltz R.L. (1991b) Ion trap tandem mass spectrometric evidence for the metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine to the potent neurotoxins 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxyamphetamine. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 626-32.
- Lin H.Q., Burden P.M., Christie M.J. y Johnston G.A. (1999) The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **62**, 403-8.
- Lin R.C., Smith R.S. y Lumeng L. (1988) Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. *J. Clin. Invest.* **81**, 615-9.
- Lindboe C.F. y Loberg E.M. (1988) The frequency of brain lesions in alcoholics. Comparison between the 5-year periods 1975-1979 and 1983-1987. *J. Neurol. Sci.* **88**, 107-13.
- Littleton J.M., Griffiths P.J. y Ortiz A. (1974) The induction of ethanol dependence and the ethanol withdrawal syndrome: the effects of pyrazole. *J. Pharm. Pharmacol.* **26**, 81-91.
- Liu W., Thielen R.J., Rodd Z.A. y McBride W.J. (2006) Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* **40**, 167-76.
- Liu X. y Weiss F. (2002) Reversal of ethanol-seeking behavior by D1 and D2 antagonists in an animal model of relapse: differences in antagonist potency in previously ethanol-dependent versus nondependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 882-9.
- Logan B.J., Lavery R., Sanderson W.D. y Yee Y.B. (1988) Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* **152**, 227-34.
- Lomax P., Bajorek J.G., Chesarek W.A. y Chaffee R.R. (1980) Ethanol-induced hypothermia in the rat. *Pharmacology* **21**, 288-94.
- Lovinger D.M., White G. y Weight F.F. (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* **243**, 1721-4.
- Lovinger D.M. (1993) Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 19-27.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75.
- Lucchi L., Rius R.A., Uzumaki H., Govoni S. y Trabucchi M. (1984) Chronic ethanol changes opiate receptor function in rat striatum. *Brain Res.* **293**, 368-71.
- Lyles J. y Cadet J.L. (2003) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **42**, 155-68.
- Lyon R.A., Glennon R.A. y Titeler M. (1986) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): stereoselective interactions at brain 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **88**, 525-6.
- Maickel R.P. y Nash J.F. Jr (1985) Differing effects of short-chain alcohols on body temperature and coordinated muscular activity in mice. *Neuropharmacology* **24**, 83-9.

- Maier D.M. y Pohorecky L.A. (1987) The effect of repeated withdrawal episodes on acquisition and loss of tolerance to ethanol in ethanol-treated rats. *Physiol. Behav.* **40**, 411-24.
- Maines M.D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *FASEB J.* **2**, 2557-68.
- Malberg J.E., Sabol K.E. y Seiden L.S. (1996) Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 258-67.
- Malberg J.E. y Seiden L.S. (1998) Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J. Neurosci.* **18**, 5086-94.
- Maldonado E. y Navarro J.F. (2000) Effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on anxiety in mice tested in the light-dark box. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* **24**, 463-72.
- Mann H., Ladenheim B., Hirata H., Moran T.H. y Cadet J.L. (1997) Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (mdr1a) knockout mice. *Brain Res.* **769**, 340-6.
- Mansouri A., Demeilliers C., Amsellem S., Pessayre D. y Fromenty B. (2001) Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 737-43.
- Mantere T., Tupala E., Hall H., Sarkioja T., Rasanen P., Bergstrom K., Callaway J. y Tiihonen J. (2002) Serotonin transporter distribution and density in the cerebral cortex of alcoholic and nonalcoholic comparison subjects: a whole-hemisphere autoradiography study. *Am. J. Psychiatry* **159**, 599-606.
- Marie-Claire C., Salzmann J., David A., Courtin C., Canestrelli C. y Noble F. (2007) Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Res.* **1134**, 12-17.
- Marsh J.C., Abboudi Z.H., Gibson F.M., Scopes J., Daly S., O'Shaunnessy D.F., Baughan A.S. y Gordon-Smith E.C. (1994) Aplastic anaemia following exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy'). *Br. J. Haematol.* **88**, 281-5.
- Marston H.M., Reid M.E., Lawrence J.A., Olverman H.J. y Butcher S.P. (1999) Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **144**, 67-76.
- Mateo Y., Ruiz-Ortega J.A., Pineda J., Ugedo L. y Meana J.J. (2000) Inhibition of 5-hydroxytryptamine reuptake by the antidepressant citalopram in the locus coeruleus modulates the rat brain noradrenergic transmission in vivo. *Neuropharmacology* **39**, 2036-43.
- Mathews T.A., John C.E., Lapa G.B., Budygin E.A. y Jones S.R. (2006) No role of the dopamine transporter in acute ethanol effects on striatal dopamine dynamics. *Synapse* **60**, 288-94.
- Mayerhofer A., Kovar K.A. y Schmidt W.J. (2001) Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. *Neurosci. Lett.* **308**, 99-102.
- McCann U.D. y Ricaurte G.A. (1991) Lasting neuropsychiatric sequelae of (+/-)methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') in recreational users. *J. Clin. Psychopharmacol.* **11**, 302-5.
- McCann U.D., Ridenour A., Shaham Y. y Ricaurte G.A. (1994) Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "Ecstasy"): a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology* **10**, 129-38.
- McCann U.D., Slate S.O. y Ricaurte G.A. (1996) Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'ecstasy'). *Drug Saf.* **15**, 107-15.
- McCann U.D., Szabo Z., Scheffel U., Dannals R.F. y Ricaurte G.A. (1998) Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* **352**, 1433-7.
- McCann U.D., Eligulashvili V., Mertl M., Murphy D.L. y Ricaurte G.A. (1999) Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users.

- Psychopharmacology (Berl)* **147**, 56-65.
- McCann U.D. y Ricaurte G.A. (2001) Caveat emptor: editors beware. *Neuropsychopharmacology* **24**, 333-6.
- McCreary A.C., Bankson M.G. y Cunningham K.A. (1999) Pharmacological studies of the acute and chronic effects of (+)-3, 4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine (1B/1D) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 965-73.
- McGuire P. y Fahy T. (1991) Chronic paranoid psychosis after misuse of MDMA ("ecstasy"). *BMJ* **302**, 697.
- McGuire P. (2000) Long term psychiatric and cognitive effects of MDMA use. *Toxicol. Lett.* **112-113**, 153-6.
- McKenna D.J. y Peroutka S.J. (1990) Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J. Neurochem.* **54**, 14-22.
- McKenna D.J., Guan X.M. y Shulgin A.T. (1991) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) analogues exhibit differential effects on synaptosomal release of 3H-dopamine and 3H-5-hydroxytryptamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 505-12.
- McKinnon G., Davidson M., De Jersey J., Shanley B. y Ward L. (1987) Effects of acetaldehyde on polymerization of microtubule proteins. *Brain Res.* **416**, 90-9.
- Mechan A.O., O'Shea E., Elliott J.M., Colado M.I. y Green A.R. (2001) A neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) to rats results in a long-term defect in thermoregulation. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 413-8.
- Mechan A.O., Esteban B., O'Shea E., Elliott J.M., Colado M.I. y Green A.R. (2002a) The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 170-80.
- Meek J.L. y Neff N.H. (1972) Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J. Neurochem.* **19**, 1519-25.
- Melendez R.I., Hicks M.P., Cagle S.S. y Kalivas P.W. (2005) Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **29**, 326-33.
- Melichar J.K., Daglish M.R. y Nutt D.J. (2001) Addiction and withdrawal--current views. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 84-90.
- Meltzer H.Y. y Maes M. (1995) Pindolol pretreatment blocks stimulation by meta-chlorophenyl-piperazine of prolactin but not cortisol secretion in normal men. *Psychiatry Res.* **58**, 89-98.
- Mena M.A. y Herrera E. (1980) Monoamine metabolism in rat brain regions following long term alcohol treatment. *J. Neural. Transm.* **47**, 227-36.
- Mereu G. y Gessa G.L. (1984) Ethanol excites dopamine (DA) neurons and inhibits non-dopamine (non-DA) neurons in the Substantia nigra of rats. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **20**, 11-5.
- Meyer J.S. y Ali S.F. (2002) Serotonergic neurotoxicity of MDMA (ecstasy) in the developing rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **965**, 373-80.
- Meyer J.S., Grande M., Johnson K. y Ali S.F. (2004) Neurotoxic effects of MDMA ("ecstasy") administration to neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22**, 261-71.
- Mhatre M.C. y Ticku M.K. (1992) Chronic ethanol administration alters gamma-aminobutyric acidA receptor gene expression. *Mol. Pharmacol.* **42**, 415-22.
- Mhatre M.C. y Ticku M.K. (1993) Alcohol: effects on GABAA receptor function and gene expression. *Alcohol Alcohol Suppl.* **2**, 331-5.
- Milhazes N., Cunha-Oliveira T., Martins P., Garrido J., Oliveira C., Rego A.C. y Borges F. (2006) Synthesis and cytotoxic profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its metabolites on undifferentiated PC12 cells: A putative structure-toxicity relationship. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1294-304.
- Miller D.B. y O'Callaghan J.P. (1994) Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 752-60.

- Miller D.B. y O'Callaghan J.P. (1995) The role of temperature, stress, and other factors in the neurotoxicity of the substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine and fenfluramine. *Mol. Neurobiol.* **11**, 177-92.
- Miller R.T., Lau S.S. y Monks T.J. (1995) Metabolism of 5-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male Sprague-Dawley rats. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 634-41.
- Mills E.M., Rusyniak D.E. y Sprague J.E. (2004) The role of the sympathetic nervous system and uncoupling proteins in the thermogenesis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Mol. Med.* **82**, 787-99.
- Milroy C.M., Clark J.C. y Forrest A.R. (1996) Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J. Clin. Pathol.* **49**, 149-53.
- Mlinar B. y Corradetti R. (2003) Endogenous 5-HT, released by MDMA through serotonin transporter- and secretory vesicle-dependent mechanisms, reduces hippocampal excitatory synaptic transmission by preferential activation of 5-HT_{1B} receptors located on CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1559-71.
- Moghaddam B. y Bolinao M.L. (1994) Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* **178**, 99-102.
- Mokler D.J., Robinson S.E. y Rosecrans J.A. (1987) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) produces long-term reductions in brain 5-hydroxytryptamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **138**, 265-8.
- Molero-Chamizo A. (2005) [3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'): its long-term emotional and cognitive effects, and serotonin depletion]. *Rev. Neurol.* **41**, 108-14.
- Molliver M.E., O'Hearn E., Battaglia G. y DeSouza E.B. (1986) Direct intracerebral administration of MDA and MDMA does not produce 5-HT neurotoxicity. *Soc. Neurosci. Abstr.* **12**, 1234.
- Molliver M.E., Berger U.V., Mamounas L.A., Molliver D.C., O'Hearn E. y Wilson M.A. (1990) Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **600**, 649-61; discussion 661-4.
- Montoliu C., Sancho-Tello M., Azorin I., Bungal M., Valles S., Renau-Piqueras J. y Guerri C. (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J. Neurochem.* **65**, 2561-70.
- Morgan E.T., Koop D.R. y Coon M.J. (1982) Catalytic activity of cytochrome p450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **257**, 13951-57.
- Morgan P.F., Nadi N.S., Karanian J. y Linnoila M. (1992) Mapping rat brain structures activated during ethanol withdrawal: role of glutamate and NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **225**, 217-23.
- Morrow A.L., Devaud L.L., Bucci D. y Smith F.D. (1994) GABAA and NMDA receptor subunit mRNA expression in ethanol dependent rats. *Alcohol Alcohol Suppl.* **2**, 89-95.
- Murphy J.M., McBride W.J., Lumeng L. y Li T.K. (1983) Monoamine and metabolite levels in CNS regions of the P line of alcohol-preferring rats after acute and chronic ethanol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **19**, 849-56.
- Murphy J.M., McBride W.J., Gatto G.J., Lumeng L. y Li T.K. (1988) Effects of acute ethanol administration on monoamine and metabolite content in forebrain regions of ethanol-tolerant and -nontolerant alcohol-preferring (P) rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **29**, 169-74.
- Muuronen A., Bergman H., Hindmarsh T. y Telakivi T. (1989) Influence of improved drinking habits on brain atrophy and cognitive performance in alcoholic patients: a 5-year follow-up study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **13**, 137-41.
- Myers R.D. (1981) Alcohol's effect on body temperature: hypothermia, hyperthermia or poikilothermia? *Brain Res. Bull.* **7**, 209-20.
- Myers R.D. y Robinson D.E. (1999) Mu and D2 receptor antisense oligonucleotides injected in nucleus accumbens suppress high alcohol intake in genetic drinking HEP rats. *Alcohol* **18**, 225-33.
- Naassila M., Ledent C. y Daoust M. (2002) Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. *J. Neurosci.* **22**, 10487-93.
- Naassila M., Pierrefiche O., Ledent C. y Daoust M. (2004) Decreased alcohol sistration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **46**, 243-53.

- Nair S.G. y Gudelsky G.A. (2004) Protein kinase C inhibition differentially affects 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release in the striatum and prefrontal cortex of the rat. *Brain Res.* **1013**, 168-73.
- Nair S.G. y Gudelsky G.A. (2005) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) enhances the release of acetylcholine by 5-HT₄ and D1 receptor mechanisms in the rat prefrontal cortex. *Synapse* **58**, 229-35.
- Nair S.G. y Gudelsky G.A. (2006) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances the release of acetylcholine in the prefrontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **184**, 182-9.
- Nakamura K., Iwahashi K., Itoh M., Ameno K., Ijiri I., Takeuchi Y. y Suwaki H. (2000) Immunohistochemical study on acetaldehyde adducts in alcohol-fed mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **24**, 93-96.
- Nash J.F. Jr, Meltzer H.Y. y Gudelsky G.A. (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 873-9.
- Nash J.F. (1990) Ketanserin pretreatment attenuates MDMA-induced dopamine release in the striatum as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci.* **47**, 2401-8.
- Nash J.F., Meltzer H.Y. y Gudelsky G.A. (1990) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.* **54**, 1062-7.
- Nash J.F. y Brodtkin J. (1991) Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 820-5.
- Nash J.F. y Nichols D.E. (1991) Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine and structurally related analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **200**, 53-8.
- Nash J.F. y Yamamoto B.K. (1992) Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res.* **581**, 237-43.
- Navarro J.F. y Maldonado E. (2002) Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **26**, 1151-4.
- Ng G.Y. y George S.R. (1994) Dopamine receptor agonist reduces ethanol self-administration in the ethanol-preferring C57BL/6J inbred mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **269**, 365-74.
- Nichols D.E., Lloyd D.H., Hoffman A.J., Nichols M.B. y Yim G.K. (1982) Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of. *J. Med. Chem.* **25**, 530-5.
- Nicholls R., de Jersey J., Worrall S. y Wilce P. (1992) Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. *Int. J. Biochem.* **24**, 1899-906.
- Nixdorf W.L., Burrows K.B., Gudelsky G.A. y Yamamoto B.K. (2001) Enhancement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity by the energy inhibitor malonate. *J. Neurochem.* **77**, 647-54.
- Nordmann R. (1987) Oxidative stress from alcohol in the brain. *Alcohol Alcohol Suppl.* **1**, 75-82.
- O'Callaghan J.P. (1988) Neurotypic and gliotypic proteins as biochemical markers of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **10**, 445-52.
- O'Callaghan J.P. y Miller D.B. (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 741-51.
- O'Callaghan M.J., Croft A.P., Watson W.P., Brooks S.P. y Little H.J. (2002) Low alcohol preference among the "high alcohol preference" C57/BL10 mice; factors affecting such preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**, 475-81.
- O'Hearn E., Battaglia G., De Souza E.B., Kuhar M.J. y Molliver M.E. (1988) Methylenedioxymethamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J. Neurosci.* **8**, 2788-803.
- O'Shea E., Granados R., Esteban B., Colado M.I. y Green A.R. (1998) The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ('ecstasy'). *Neuropharmacology* **37**, 919-26.
- O'Shea E., Esteban B., Camarero J., Green A.R. y Colado M.I. (2001) Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the

- acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology* **40**, 65-74.
- O'Shea E. Y Colado M.I. (2003) Is frequent dosing with ecstasy a risky business for dopamine-containing neurons? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 272-4.
- O'Shea E., Escobedo I., Orio L., Sanchez V., Navarro M., Green A.R. y Colado M.I. (2005) Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1312-23.
- O'Shea E., Orio L., Escobedo I., Sanchez V., Camarero J., Green A.R. y Colado M.I. (2006) MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 778-85.
- Obernier J.A., White A.M., Swartzwelder H.S. y Crews F.T. (2002) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**, 521-32.
- Obradovic T., Imel K.M. y White S.R. (1996) Methylenedioxymethamphetamine-induced inhibition of neuronal firing in the nucleus accumbens is mediated by both serotonin and dopamine. *Neuroscience* **74**, 469-81.
- Obrocki J., Buchert R., Vaterlein O., Thomasius R., Beyer W. y Schiemann T. (1999) Ecstasy--long-term effects on the human central nervous system revealed by positron emission tomography. *Br. J. Psychiatry.* **175**, 186-8.
- Orio L., O'Shea E., Sanchez V., Pradillo J.M., Escobedo I., Camarero J., Moro M.A., Green A.R. y Colado M.I. (2004) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1 β levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J. Neurochem.* **89**, 1445-53.
- Palazidou E., Stephenson J., Butler J., Coskeran P., Chambers S. Y McGregor A.M. (1995) Evidence for 5-hydroxytryptamine 1A receptor involvement in the control of prolactin secretion in man. *Psychopharmacology (Berl)* **119**, 311-314.
- Palmer A.A., Moyer M.R., Crabbe J.C. y Phillips T.J. (2002) Initial sensitivity, tolerance and cross-tolerance to allopregnanolone- and ethanol-induced hypothermia in selected mouse lines. *Psychopharmacology (Berl)* **162**, 313-22.
- Papanicolaou J. y Fennessy M.R. (1980) The acute effect of ethanol on behaviour, body temperature, and brain histamine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **72**, 73-7.
- Paris J.M. y Cunningham K.A. (1992) Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res. Bull.* **28**, 115-9.
- Park W.K. y Azmitia E.C. (1991) 5-HT, MDMA (ecstasy), and nimodipine effects on 45Ca-uptake into rat brain synaptosomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **635**, 438-40.
- Parke T., Simpson D., Mitchell R., MacCallum R., Campbell-Hewson G. y Steedman D. (1996) Blood alcohol and cardiac arrest. *Resuscitation* **32**, 199-202.
- Parrott A.C., Lees A., Garnham N.J., Jones M. y Wesnes K. (1998) Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J. Psychopharmacol.* **12**, 79-83.
- Patel M.M., Belson M.G., Longwater A.B., Olson K.R. y Miller M.A. (2005) Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-related hyperthermia. *J. Emerg. Med.* **29**, 451-4.
- Pawlak R., Skrzypiec A., Sulkowski S. y Buczek W. (2002) Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* **327**, 83-6.
- Pei Q., Lewis L., Sprakes M.E., Jones E.J., Grahame-Smith D.G. y Zetterstrom T.S. (2000) Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* **39**, 463-70.
- Peng W., Premkumar A., Mossner R., Fukuda M., Lesch K.P. y Simantov R. (2002) Synaptotagmin I and IV are differentially regulated in the brain by the recreational drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res. Mol. Brain Res.* **108**, 94-101.
- Peng W. y Simantov R. (2003) Altered gene expression in frontal cortex and midbrain of 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treated mice: differential regulation of GABA transporter subtypes. *J. Neurosci. Res.* **72**, 250-8.
- Peroutka S.J. (1990) Ecstasy: the clinical, pharmacological and neurotoxic effects of the drug MDMA. *Kluwer Academic Press*, EE.UU.
- Petersen D.R. (1983) Pharmacogenetic approaches to the neuropharmacology of ethanol. *Recent. Dev. Alcohol.* **1**, 49-69.
- Piepponen T.P., Kiianmaa K. y Ahtee L. (2002) Effects of ethanol on the accumbal output of dopamine, GABA and glutamate in alcohol-tolerant and alcohol-nontolerant rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **74**, 21-30.
- Piercey M.F., Lum J.T. y Palmer J.R. (1990) Effects of MDMA ('ecstasy') on firing rates of serotonergic, dopaminergic, and noradrenergic neurons in the rat. *Brain Res.* **526**, 203-6.
- Piper B.J., Fraiman J.B. y Meyer J.S. (2005) Repeated MDMA ("Ecstasy") exposure in adolescent male rats alters temperature regulation, spontaneous motor activity, attention, and serotonin transporter binding. *Dev. Psychobiol.* **47**, 145-57.
- Piper B.J. y Meyer J.S. (2006) Increased responsiveness to MDMA in adult rats treated neonatally with MDMA. *Neurotoxicol. Teratol.* **28**, 95-102.
- Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD). Observatorio español sobre drogas (2002). Ministerio de Sanidad y Consumo. España. <http://www.msc.es/pnd>.
- Poblete J.C. y Azmitia E.C. (1995) Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Res* **680**, 9-15.
- Pohorecky L.A., Jaffe L.S. y Berkeley H.A. (1974) Effects of ethanol on serotonergic neurons in the rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **8**, 1-11.
- Pohorecky L.A., Brick J. y Sun J.Y. (1976) Serotonergic involvement in the effect of ethanol on body temperature in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 157-9.
- Pohorecky L.A. y Brick J. (1988) Pharmacology of ethanol. *Pharmacol. Ther.* **36**, 335-427.
- Pope-Coleman A., Tinker J.P. y Schneider J.S. (2000) Effects of GM1 ganglioside on pre- and postsynaptic dopaminergic markers in the striatum of parkinsonian monkeys. *Synapse* **36**, 120-8.
- Popova N.K. y Ivanova E.A. (2002) 5-HT_{1A} receptor antagonist p-MPPI attenuates acute ethanol effects in mice and rats. *Neurosci. Lett.* **322**, 1-4.
- Prada C. y Alvarez F.J. (1996) [MDMA or ecstasy: pharmacologic, toxicologic and clinical aspects]. *Med. Clin. (Barc)* **107**, 549-55.
- Pratt O.E., Rooprai H.K., Shaw G.K. y Thomson A.D. (1990) The genesis of alcoholic brain tissue injury. *Alcohol Alcohol* **25**, 217-30.
- Price L.H., Ricaurte G.A., Krystal J.H. y Heninger G.R. (1989) Neuroendocrine and mood responses to intravenous L-tryptophan in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. Preliminary observations. *Arch. Gen. Psychiatry* **46**, 20-2.
- Proctor W.R., Soldo B.L., Allan A.M. y Dunwiddie T.V. (1992) Ethanol enhances synaptically evoked GABA_A receptor-mediated responses in cerebral cortical neurons in rat brain slices. *Brain Res.* **595**, 220-7.
- Pubill D., Canudas A.M., Pallas M., Camins A., Camarasa J. y Escubedo E. (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **367**, 490-9.
- Pushpakiran G., Mahalakshmi K. y Anuradha C.V. (2004) Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues. *Amino Acids* **27**, 91-6.
- Quertemont E. y Tambour S. (2004) Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 130-4.
- Rabe C.S. y Tabakoff B. (1990) Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.* **38**, 753-7.

- Radzik D.M., Roston D.A. y Kissinger P.T. (1983) Determination of hydroxylated aromatic compounds produced via superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals by liquid chromatography/electrochemistry. *Anal. Biochem.* **131**, 458-64.
- Raskin N.H. y Sokoloff L. (1968) Brain alcohol dehydrogenase. *Science* **162**, 131-2.
- Raskin N.H. y Sokoloff L. (1972) Enzymes catalysing ethanol metabolism in neural and somatic tissues of the rat. *J. Neurochem.* **19**, 273-82.
- Rattray M. (1991) Ecstasy: towards an understanding of the biochemical basis of the actions of MDMA. *Essays Biochem.* **26**, 77-87.
- Reddy B.V., Boyadjieva N. y Sarkar D.K. (1995) Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on beta-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of beta-endorphin release. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **19**, 339-44.
- Reddy S.K., Husain K., Schlorff E.C., Scott R.B. y Somani S.M. (1999) Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. *Neurotoxicology* **20**, 977-87.
- Reneman L., Booij J., Schmand B., van den Brink W. y Gunning B. (2000a) Memory disturbances in "Ecstasy" users are correlated with an altered brain serotonin neurotransmission. *Psychopharmacology (Berl)* **148**, 322-4.
- Reneman L., Habraken J.B., Majoie C.B., Booij J. y den Heeten G.J. (2000b) MDMA ("Ecstasy") and its association with cerebrovascular accidents: preliminary findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **21**, 1001-7.
- Reneman L., Majoie C.B., Flick H. y den Heeten G.J. (2002) Reduced N-acetylaspartate levels in the frontal cortex of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) users: preliminary results. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **23**, 231-7.
- Reveron M.E., Monks T.J. y Duvauchelle C.L. (2005) Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* **26**, 1031-40.
- Reynolds J.N., Prasad A. y MacDonald J.F. (1992) Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **224**, 173-81.
- Ricaurte G.A., Bryan G., Strauss L., Seiden L. Y Schuster C. (1985) Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science* **229**, 986-88.
- Ricaurte G.A., DeLanney L.E., Irwin I. y Langston J.W. (1988a) Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res.* **446**, 165-8.
- Ricaurte G.A., DeLanney L.E., Wiener S.G., Irwin I. y Langston J.W. (1988b) 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res.* **474**, 359-63.
- Ricaurte G.A., Forno L.S., Wilson M.A., DeLanney L.E., Irwin I., Molliver M.E. y Langston J.W. (1988c) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *JAMA* **260**, 51-5.
- Ricaurte G.A., Martello A.L., Katz J.L. y Martello M.B. (1992) Lasting effects of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: neurochemical observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 616-22.
- Ricaurte G.A. y McCann U.D. (1992) Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **648**, 371-82.
- Ricaurte G.A., Markowska A.L., Wenk G.L., Hatzidimitriou G., Wlos J. y Olton D.S. (1993) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**, 1097-105.
- Ricaurte G.A., McCann U.D., Szabo Z. y Scheffel U. (2000) Toxicodynamics and long-term toxicity of the recreational drug, 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). *Toxicol. Lett.* **112-113**, 143-6.
- Ricaurte G.A., Yuan J. y McCann U.D. (2000) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology* **42**, 5-10.

- Rintala J., Jaatinen P., Parkkila S., Sarviharju M., Kiiänmaa K., Hervonen A. y Niemela O. (2000) Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* **35**, 458-63.
- Risinger F.O., Freeman P.A., Rubinstein M., Low M.J. y Grandy D.K. (2000) Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **152**, 343-50.
- Risinger F.O., Freeman P.A., Greengard P. y Fienberg A.A. (2001) Motivational effects of ethanol in DARPP-32 knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**, 340-8.
- Robbins T.W. y Everitt B.J. (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 228-36.
- Roberto M., Bajo M., Crawford E., Madamba S.G. y Siggins G.R. (2006) Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala. *Neuropsychopharmacology* **31**, 988-96.
- Robledo P., Mendizabal V., Ortuno J., de la Torre R., Kieffer B.L. y Maldonado R. (2004) The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 853-8.
- Rodd Z.A., Bell R.L., McQueen V.K., Davids M.R., Hsu C.C., Murphy J.M., Li T.K., Lumeng L. y McBride W.J. (2005) Chronic ethanol drinking by alcohol-preferring rats increases the sensitivity of the posterior ventral tegmental area to the reinforcing effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **29**, 358-66.
- Rodrigo R., Thielemann L., Olea M., Munoz P., Cereceda M. y Orellana M. (1998) Effect of ethanol ingestion on renal regulation of water and electrolytes. *Arch. Med. Res.* **29**, 209-18.
- Roehrs T. y Roth T. (2001) Sleep, sleepiness, and alcohol use. *Alcohol Res. Health* **25**, 101-9.
- Roehrs T., Burduvali E., Bonahoom A., Drake C. y Roth T. (2003) Ethanol and sleep loss: a "dose" comparison of impairing effects. *Sleep* **26**, 981-5.
- Ross J.D., Herin D.V., Frankel P.S., Thomas M.L. y Cunningham K.A. (2006) Chronic treatment with a serotonin(2) receptor (5-HT₂R) agonist modulates the behavioral and cellular response to (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Drug Alcohol Depend.* **81**, 117-27.
- Rossetti Z.L., Melis F., Carboni S., Diana M. y Gessa G.L. (1992) Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in estraneuronal dopamine. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**(3), 529-32.
- Rouach H., Park M.K., Orfanelli M.T., Janvier B. y Nordmann R. (1987) Ethanol-induced oxidative stress in the rat cerebellum. *Alcohol Alcohol Suppl.* **1**, 207-11.
- Rout U.K. (1992) Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**, 286-9.
- Roy A., Adinoff B., DeJong J. y Linnoila M. (1991) Cerebrospinal fluid variables among alcoholics lack seasonal variation. *Acta Psychiatr. Scand* **84**, 579-82.
- Rubin E. y Lieber C.S. (1967) Experimental alcoholic hepatic injury in man: ultrastructural changes. *Fed. Proc.* **26**, 1458-67.
- Rudnick G. y Wall S.C. (1992) The molecular mechanism of "ecstasy". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 1817-21.
- Rustay N.R., Boehm S.L., Schafer G.L., Browman K.E., Erwin V.G. y Crabbe J.C. (2001) Sensitivity and tolerance to ethanol-induced incoordination and hypothermia in HAFT and LAFT mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **70**, 167-74.
- Rutty G.N. y Milroy C.M. (1997) The pathology of the ring-substituted amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). *J. Pathol.* **181**, 255-6.
- Saadat K.S., O'shea E., Colado M.I., Elliott J.M. y Green A.R. (2005) The role of 5-HT in the impairment of thermoregulation observed in rats administered MDMA ('ecstasy') when housed at high ambient temperature. *Psychopharmacology (Berl)* **179**, 884-90.
- Sabol K.E., Lew R., Richards J.B., Vosmer G.L. y Seiden L.S. (1996) Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: Synaptosomal uptake and tissue concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 846-54.
- Sabol K.E. y Seiden L.S. (1998) Reserpine attenuates D-amphetamine and MDMA-induced transmitter release in vivo: a consideration of dose, core temperature and dopamine synthesis. *Brain Res.* **806**, 69-78.

- Sadzot B., Baraban J.M., Glennon R.A., Lyon R.A., Leonhardt S., Jan C.R. y Titeler M. (1989) Hallucinogenic drug interactions at human brain 5-HT₂ receptors: implications for treating LSD-induced hallucinogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* **98**, 495-9.
- Saeed Dar M. y Wooles W.R. (1984) The effect of acute ethanol on dopamine metabolism and other neurotransmitters in the hypothalamus and the corpus striatum of mice. *J. Neural. Transm.* **60**, 283-94.
- Sagara Y., Dargusch R., Chambers D., Davis J., Schubert D. y Maher P. (1998) Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1375-89.
- Salzmann J., Marie-Claire C., Le Guen S., Roques B.P. y Noble F. (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 831-8.
- Samson H.H. y Harris R.A. (1992) Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 206-11.
- Samson Y., Baron J.C., Feline A., Bories J. y Crouzel C. (1986) Local cerebral glucose utilisation in chronic alcoholics: a positron tomography study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **49**, 1165-70.
- Sanchez V., Camarero J., Esteban B., Peter M.J., Green A.R. y Colado M.I. (2001) The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 46-57.
- Sanchez V., Camarero J., O'Shea E., Green A.R. y Colado M.I. (2003) Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats. *Neuropharmacology* **44**, 449-61.
- Sanchez V., O'Shea E., Saadat K.S., Elliott J.M., Colado M.I. y Green A.R. (2004) Effect of repeated ('binge') dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J. Psychopharmacol.* **18**, 412-6.
- Sasame H.A., Ames M.M. y Nelson S.D. (1977) Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **78**, 919-26.
- Scanzello C.R., Hatzidimitriou G., Martello A.L., Katz J.L. y Ricaurte G.A. (1993) Serotonergic recovery after (+/-) 3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 1484-91.
- Scearce-Levie K., Viswanathan S.S. y Hen R. (1999) Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT_{1B} receptor. *Psychopharmacology (Berl)* **141**, 154-61.
- Schatz D.S., Kaufmann W.A., Schuligoi R., Humpel C. y Saria A. (2000) 3,4-Methylenedioxymetamphetamine (ecstasy) induces c-fos-like protein and mRNA in rat organotypic dorsal striatal slices. *Synapse* **36**, 75-83.
- Scheffel U., Szabo Z., Mathews W.B., Finley P.A., Dannals R.F., Ravert H.T., Szabo K., Yuan J. y Ricaurte G.A. (1998) In vivo detection of short- and long-term MDMA neurotoxicity--a positron emission tomography study in the living baboon brain. *Synapse* **29**, 183-92.
- Schifano F., Di Furia L., Forza G., Minicuci N. y Bricolo R. (1998) MDMA ("ecstasy") consumption in the context of polydrug abuse: a report on 150 patients. *Drug Alcohol Depend.* **52**, 85-90.
- Schmidt C.J., Wu L. y Lovenberg W. (1986) Methylenedioxymetamphetamine: a potentially neurotoxic amphetamine analogue. *Eur. J. Pharmacol.* **124**, 175-8.
- Schmidt C.J. (1987a) Acute administration of methylenedioxymetamphetamine: comparison with the neurochemical effects of its N-desmethyl and N-ethyl analogs. *Eur. J. Pharmacol.* **136**, 81-8.
- Schmidt C.J. (1987b) Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymetamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 1-7.
- Schmidt C.J., Levin J.A. y Lovenberg W. (1987c) In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymetamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 747-55.
- Schmidt C.J. y Taylor V.L. (1987) Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymetamphetamine. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 4095-102.
- Schmidt C.J. y Taylor V.L. (1988) Direct central effects of acute methylenedioxymetamphetamine on serotonergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **156**, 121-31.

- Schmidt C.J., Abbate G.M., Black C.K. y Taylor V.L. (1990a) Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 478-83.
- Schmidt C.J., Black C.K., Abbate G.M. y Taylor V.L. (1990b) Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT₂ receptors. *Brain Res.* **529**, 85-90.
- Schmidt C.J. y Kehne J.H. (1990) Neurotoxicity of MDMA: neurochemical effects. *Ann N Y Acad Sci* **600**, 665-80; discussion 680-1.
- Schmidt C.J. y Taylor V.L. (1990) Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine by 5-HT uptake inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **181**, 133-6.
- Schuckit M.A. y Smith T.L. (1996) An 8-year follow-up of 450 sons of alcoholic and control subjects. *Arch. Gen. Psychiatry.* **53**, 202-10.
- Schulz R., Wuster M., Duka T. y Herz A. (1980) Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology (Berl)* **68**, 221-7.
- Schweinsburg B.C., Taylor M.J., Alhassoon O.M., Videen J.S., Brown G.G., Patterson T.L., Berger F. y Grant I. (2001) Chemical pathology in brain white matter of recently detoxified alcoholics: a 1H magnetic resonance spectroscopy investigation of alcohol-associated frontal lobe injury. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **25**, 924-34.
- Segal D.S., Kuczenski R., O'Neil M.L., Melega W.P. y Cho A.K. (2003) Escalating dose methamphetamine pretreatment alters the behavioral and neurochemical profiles associated with exposure to a high-dose methamphetamine binge. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1730-40.
- Seizinger B.R., Bovermann K., Maysinger D., Holtt V. y Herz A. (1983) Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide systems in discrete regions of rat brain and pituitary. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18** (1), 361-9.
- Seizinger B.R., Bovermann K., Holtt V. y Herz A. (1984a) Enhanced activity of the beta-endorphinergic system in the anterior and neurointermediate lobe of the rat pituitary after chronic treatment with ethanol liquid diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**, 455-61.
- Seizinger B.R., Holtt V. y Herz A. (1984b) Effects of chronic ethanol treatment on the in vitro biosynthesis of pro-opiomelanocortin and its posttranslational processing to beta-endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *J. Neurochem.* **43**, 607-13.
- Selim M. y Bradberry C.W. (1996) Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. *Brain Res.* **716**, 157-64.
- Semple D.M., Ebmeier K.P., Glabus M.F., O'Carroll R.E. y Johnstone E.C. (1999) Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ('ecstasy') users. *Br. J. Psychiatry* **175**, 63-9.
- Sepulveda C., Bustos G., Gysling K., Seguel M. y Labarca R. (1995) Effects of in vitro ethanol and chronic ethanol consumption on the release of excitatory amino acids in the rat hippocampus. *Brain Res.* **674**, 104-6.
- Shankaran M. y Gudelsky G.A. (1998) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on hippocampal dopamine and serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **61**, 361-6.
- Shankaran M., Yamamoto B.K. y Gudelsky G.A. (1999a) Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* **385**, 103-10.
- Shankaran M., Yamamoto B.K. y Gudelsky G.A. (1999b) Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum. *J. Neurochem.* **72**, 2516-22.
- Shankaran M. y Gudelsky G.A. (1999) A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology (Berl)* **147**, 66-72.
- Shankaran M., Yamamoto B.K. y Gudelsky G.A. (2001) Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. *Synapse* **40**, 55-64.

- Sharkey J., McBean D.E. y Kelly P.A. (1991) Alterations in hippocampal function following repeated exposure to the amphetamine derivative methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* **105**, 113-8.
- Sheela Rani C.S. y Ticku M.K. (2006) Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA(A) and NMDA receptor subunits. *Alcohol* **38**, 89-97.
- Shen R.Y. y Chiodo L.A. (1993) Acute withdrawal after repeated ethanol treatment reduces the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* **622**, 289-93.
- Shippenberg T.S. y Elmer G.I. (1998) The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit. Rev. Neurobiol.* **12**, 267-303.
- Shirayama Y., Hashimoto K., Iyo M., Watanabe K., Higuchi T. y Minabe Y. (2000) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. *Eur. J. Pharmacol.* **402**, 215-22.
- Shulgin A.T. y Nichols D.E. (1978) Characterization of three new psychotomimetics., in *The Psychopharmacology of Hallucinogens.*, (Stilman R. Y Willete R., eds), Pergamon Press, New York.
- Silvestre J.S., O'Neill M.F., Fernandez A.G. y Palacios J.M. (1996) Effects of a range of dopamine receptor agonists and antagonists on ethanol intake in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **318**, 257-65.
- Simantov R. y Tauber M. (1997) The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB J.* **11**, 141-6.
- Simantov R. y Peng W. (2004) MDMA (Ecstasy) controls in concert a group of genes involved in GABA neurotransmission. *FEBS Lett.* **563**, 3-6.
- Simpson D.L. y Rumack B.H. (1981) Methylenedioxymphetamine. Clinical description of overdose, death and review of pharmacology. *Arch. Intern. Med.* **141**, 1507-09.
- Sippel H.W. (1974) The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *J. Neurochem.* **23**, 451-2.
- Slikker W. Jr, Ali S.F., Scallet A.C., Frith C.H., Newport G.D. y Bailey J.R. (1988) Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **94**, 448-57.
- Slikker W. Jr, Holson R.R., Ali S.F., Kolta M.G., Paule M.G., Scallet A.C., McMillan D.E., Bailey J.R., Hong J.S., y Scalzo F.M. (1989) Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology* **10**, 529-42.
- Smith A.M., Zeve D.R., Grisel J.J. y Chen W.J. (2005) Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **160**, 231-8.
- Smith S.L., Jennett R.B., Sorrell M.F. y Tuma D.J. (1989) Acetaldehyde substoichiometrically inhibits bovine neurotubulin polymerization. *J. Clin. Invest.* **84**, 337-41.
- Snell L.D., Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1993) Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res.* **602**, 91-8.
- Soldo B.L., Proctor W.R. y Dunwiddie T.V. (1994) Ethanol differentially modulates GABAA receptor-mediated chloride currents in hippocampal, cortical, and septal neurons in rat brain slices. *Synapse* **18**, 94-103.
- Somani S.M., Husain K., Diaz-Phillips L., Lanzotti D.J., Kareti K.R. y Trammell G.L. (1996) Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol* **13**, 603-10.
- Spagnolo A. (1993) Teratogenesis of alcohol. *Ann Ist Super Sanita* **29**, 89-96.
- Spanagel R., Siegmund S., Cowen M., Schroff K.C., Schumann G., Fiserova M., Sillaber I., Wellek S., Singer M. y Putzke J. (2002) The neuronal nitric oxide synthase gene is critically in neurobehavioral effects of alcohol. *J. Neurosci.* **22**, 8676-83.
- Spanos L.J. y Yamamoto B.K. (1989) Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32**, 835-40.
- Sprague J.E., Huang X., Kanthasamy A. y Nichols D.E. (1994) Attenuation of 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Life Sci.* **55**, 1193-8.
- Sprague J.E. y Nichols D.E. (1995) The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 667-73.
- Sprague J.E., Everman S.L. y Nichols D.E. (1998) An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology* **19**, 427-41.
- Sprague J.E., Mallett N.M., Rusyniak D.E. y Mills E. (2004) UCP3 and thyroid hormone involvement in methamphetamine-induced hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1339-43.
- St Omer V.E., Ali S.F., Holson R.R., Duhart H.M., Scalzo F.M. y Slikker W. Jr (1991) Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylenedioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **13**, 13-20.
- Stanford I.M. y Lacey M.G. (1996) Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT1B y 5-HT2C receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J. Neurosci.* **16**, 7566-73.
- Steele T.D., Nichols D.E. y Yim G.K. (1987) Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and related amphetamine derivatives on inhibition of uptake of. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2297-303.
- Steele T.D., Nichols D.E. y Yim G.K. (1989) MDMA transiently alters biogenic amines and metabolites in mouse brain and heart. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**, 223-7.
- Stein D.J. y Rink J. (1999) Effects of "Ecstasy" blocked by serotonin reuptake inhibitors. *J. Clin. Psychiatry* **60**, 485.
- Steinberg J.J., Oliver G.W. Jr. y Cajigas A. (1997) The formation and measurement of DNA neuroadduction in alcoholism. Case report. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **18**, 84-91.
- Stephenson C.P., Hunt G.E., Topple A.N. y McGregor I.S. (1999) The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine "Ecstasy"-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience* **92**, 1011-23.
- Steward O. Y Worley P.F. (2001) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7062-8.
- Stewart R.B., Gatto G.J., Lumeng L., Li T.K. y Murphy J.M. (1993) Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* **10**, 1-10.
- Stone D.M., Stahl D.C., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1986) The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **128**, 41-8.
- Stone D.M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1987a) Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* **26**, 1657-61.
- Stone D.M., Johnson M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1987b) A comparison of the neurotoxic potential of methylenedioxyamphetamine (MDA) and its N-Methylated and N-ethylated derivatives. *Eur. J. Pharmacol.* **134**, 245-8.
- Stone D.M., Merchant K.M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1987c) Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat. *Neuropharmacology* **26**, 1677-83.
- Stone D.M., Johnson M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1988) Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**, 79-87.
- Stone D.M., Johnson M., Hanson G.R. y Gibb J.W. (1989) Acute inactivation of tryptophan hydroxylase by amphetamine analogs involves the oxidation of sulfhydryl sites. *Eur. J. Pharmacol.* **172**, 93-7.
- Swanson L.W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* **9**, 321-53.
- Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1983) Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.* **32**, 197-204.

- Tabakoff B. y Culp S.G. (1984) Studies on tolerance development in inbred and heterogeneous stock National Institutes of Health rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **8**, 495-9.
- Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1996) Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron*. **16**, 909-12.
- Taffe M.A., Weed M.R., Davis S., Huitron-Resendiz S., Schroeder R., Parsons L.H., Henriksen S.J. y Gold L.H. (2001) Functional consequences of repeated (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* **24**, 230-9.
- Taffe M.A., Lay C.C., Von Huben S.N., Davis S.A., Crean R.D. y Katner S.N. (2006) Hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in unrestrained rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* **82**, 276-81.
- Tampier L., Quintanilla M.E. y Mardones J. (2000) Acute tolerance, alcohol sensitivity and drinking pattern in the F2 generation of UChA and UChB rats. *J. Stud. Alcohol* **61**, 647-51.
- Taraska T. y Finnegan K.T. (1997) Nitric oxide and the neurotoxic effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 941-7.
- Teschke R., Hasumura Y. y Lieber C.S. (1977) Hepatic pathways of ethanol and acetaldehyde metabolism and their role in the pathogenesis of alcohol-induced liver injury. *Nutr. Metab.* **21** (1), 144-7.
- Thiagarajan A.B., Mefford I.N. y Eskay R.L. (1989) Single-dose ethanol administration activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: exploration of the mechanism of action. *Neuroendocrinology* **50**, 427-32.
- Thiele T.E., Willis B., Stadler J., Reynolds J.G., Bernstein I.L. y McKnight G.S. (2000) High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice. *J. Neurosci.* **20**, 75.
- Thomas J.D., Fleming S.L. y Riley E.P. (2002) Administration of low doses of MK-801 during ethanol withdrawal in the developing rat pup attenuates alcohol's teratogenic effects. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**, 1307-13.
- Thomas D.S., Randall C.L. y Carrigan M.H. (2003) Drinking to cope in socially anxious individuals: a controlled study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 1937-43.
- Thomasius R., Zapletalova P., Petersen K., Buchert R., Andresen B., Wartberg L., Nebeling B. y Schmoldt A. (2006) Mood, cognition and serotonin transporter availability in current and former ecstasy (MDMA) users: the longitudinal perspective. *J. Psychopharmacol.* **20**, 211-25.
- Tindberg N. y Ingelman-Sundberg M. (1996) Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *J. Neurochem.* **67**, 2066-73.
- Tuomainen P., Patsenka A., Hyytiä P., Grinevich V. Y Kijanmaa K. (2003) Extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens in AA and ANA rats after reverse microdialysis of ethanol into the nucleus accumbens or ventral tegmental area. *Alcohol* **29**(2), 117-24.
- Trevisan L., Fitzgerald L.W., Brose N., Gasic G.P., Heinemann S.F., Duman R.S. y Nestler E.J. (1994) Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J. Neurochem.* **62**, 1635-8.
- Tsai G. y Coyle J.T. (1998) The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu. Rev. Med.* **49**, 173-84.
- Tucker G.T., Lennard M.S., Ellis S.W., Woods H.F., Cho A.K., Lin L.Y., Hiratsuka A., Schmitz D.A. y Chu T.Y. (1994) The demethylation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1151-6.
- Ueno Y., Fukunaga T., Mizoi Y., Adachi J. y Fujiwara S. (1990) A pharmacokinetic study of ethanol elimination--first pass metabolism and elimination rate. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison* **25**, 103-15.
- Ulm R.R., Volpicelli J.R. y Volpicelli L.A. (1995) Opiates and alcohol self-administration in animals. *J. Clin. Psychiatry* **56**, Suppl 7, 5-14.
- Upadhy S.C. y Ravindranath V. (2002) Detection and localization of protein-acetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**, 856-63.
- Uysal M., Kutalp G., Ozdemirler G. y Aykac G. (1989) Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. *Drug Alcohol Depend.* **23**, 227-30.
- Uzbay I.T., Usanmaz S.E., Tapanyigit E.E., Aynacioglu S. y Akarsu E.S. (1998) Dopaminergic and serotonergic

- alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: association with behavioral signs. *Drug Alcohol Depend.* **53**, 39-47.
- Uzbay I.T., Usanmaz S.E. y Akarsu E.S. (2000) Effects of chronic ethanol administration on serotonin metabolism in the various regions of the rat brain. *Neurochem. Res.* **25**, 257-62.
- Vaillend C. Y Billard J.M. (2002) Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: Role for GABA-A receptors? *Hippocampus* **12**, 713-17.
- Vasconcelos S.M., Cavalcante R.A., Aguiar L.M., Sousa F.C., Fonteles M.M. y Viana G.S. (2004) Effects of chronic ethanol treatment on monoamine levels in rat hippocampus and striatum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 1839-46.
- Verkes R.J., Gijsman H.J., Pieters M.S., Schoemaker R.C., de Visser S., Kuijpers M., Pennings E.J., de Bruin D., Van de Wijngaart G., Van Gerven J.M. y Cohen A.F. (2001) Cognitive performance and serotonergic function in users of ecstasy. *Psychopharmacology (Berl)* **153**, 196-202.
- Vollenweider F.X., Gamma A., Liechti M. y Huber T. (1998) Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naïve healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* **19**, 241-51.
- Vollenweider F.X., Jones R.T. y Baggott M.J. (2001) Caveat emptor: editors beware. *Neuropsychopharmacology* **24**, 461-3.
- Vollenweider F.X., Liechti M.E., Gamma A., Greer G. y Geyer M. (2002) Acute psychological and neurophysiological effects of MDMA in humans. *J. Psychoactive Drugs* **34**, 171-84.
- Volpicelli J.R., Davis M.A. y Olgin J.E. (1986) Naltrexone blocks the post-shock increase of ethanol consumption. *Life Sci.* **38**, 841-7.
- Von Huben S.N., Lay C.C., Crean R.D., Davis S.A., Katner S.N. y Taffe M.A. (2007) Impact of ambient temperature on hyperthermia induced by (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine in rhesus macaques. *Neuropsychopharmacology* **32**, 673-81.
- Wafford K.A., Burnett D.M., Leidenheimer N.J., Burt D.R., Wang J.B., Kofuji P., Dunwiddie T.V., Harris R.A. y Sikela J.M. (1991) Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron*. **7**, 27-33.
- Wagman A.M. y Allen R.P. (1975) Effects of alcohol ingestion and abstinence on slow wave sleep of alcoholics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **59**, 453-66.
- Walker D.W. y Freund G. (1971) Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiol. Behav.* **7**, 773-8.
- Walker D.W. y Freund G. (1973) Impairment of timing behavior after prolonged alcohol consumption in rats. *Science* **182**, 597-9.
- Walker R.M., McElligott T.F., Power E.M., Massey T.E. y Racz W.J. (1983) Increased acetaminophen-induced hepatotoxicity after chronic ethanol consumption in mice. *Toxicology* **28**, 193-206.
- Wallace T.L., Gudelsky G.A. y Vorhees C.V. (2001) Alterations in diurnal and nocturnal locomotor activity in rats treated with a monoamine-depleting regimen of methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **153**, 321-6.
- Wand G.S. (1990) Differential regulation of anterior pituitary corticotrope function is observed in vivo but not in vitro in two lines of ethanol-sensitive mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **14**, 100-6.
- Wang X., Baumann M.H., Xu H. y Rothman R.B. (2004) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse* **53**, 240-8.
- Wang X., Baumann M.H., Xu H., Morales M. y Rothman R.B. (2005) (+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine administration to rats does not decrease levels of the serotonin transporter protein or alter its distribution between endosomes and the plasma membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1002-12.
- Ward R.J., Kest W., Bruyeer P., Lallemand F. y De Witte P. (2001) Taurine modulates catalase, aldehyde dehydrogenase, and ethanol elimination rates in rat brain. *Alcohol Alcohol* **36**, 39-43.

- Warner M., Stromstedt M., Wyss A. y Gustafsson J.A. (1993) Regulation of cytochrome P450 in the central nervous system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **47**, 191-4.
- Warner M. y Gustafsson J.A. (1994) Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 1019-23.
- Watts L.T., Rathinam M.L., Schenker S. y Henderson G.I. (2005) Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *J. Neurosci. Res.* **80**, 655-66.
- Weight F.F., Lovinger D.M. y White G. (1991) Alcohol inhibition of NMDA channel function. *Alcohol Alcohol Suppl.* **1**, 163-9.
- Weiner J.L., Zhang L. y Carlen P.L. (1994) Potentiation of GABAA-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 1388-95.
- Weiss F., Lorang M.T., Bloom F.E. y Koob G.F. (1993) Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 250-8.
- Weiss F., Parsons L.H., Schulteis G., Hyttia P., Lorang M.T., Bloom F.E. y Koob G.F. (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J. Neurosci.* **16**, 3474-85.
- Weiss F. y Porrino L.J. (2002) Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J. Neurosci.* **22**, 3332-7.
- White S.R., Duffy P. y Kalivas P.W. (1994) Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo. *Neuroscience* **62**, 41-50.
- Whiteman P.J., Hoffman R.S. y Goldfrank L.R. (2000) Alcoholism in the emergency department: an epidemiologic study. *Acad. Emerg. Med.* **7**, 14-20.
- Wilson M.A., Ricaurte G.A. y Molliver M.E. (1989) Distinct morphologic classes of serotonergic axons in primates exhibit differential vulnerability to the psychotropic drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuroscience* **28**, 121-37.
- Williams M.T., Morford L.L., Wood S.L., Rock S.L., McCrea A.E., Fukumura M., Wallace T.L., Broening H.W., Moran M.S. y Vorhees C.V. (2003) Developmental 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs sequential and spatial but not cued learning independent of growth, litter effects or injection stress. *Brain Res.* **968**, 89-101.
- Winstock A.R., Griffiths P. y Stewart D. (2001) Drugs and the dance music scene: a survey of current drug use patterns among a sample of dance music enthusiasts in the UK. *Drug Alcohol Depend.* **64**, 9-17.
- Wozniak K.M., Pert A., Mele A. y Linnoila M. (1991) Focal application of alcohols elevates extracellular dopamine in rat brain: a microdialysis study. *Brain Res.* **540**, 31-40.
- Wrona M.Z. y Dryhurst G. (1991) Interactions of 5-hydroxytryptamine with oxidative enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1145-62.
- Wyatt T.A., Kharbanda K.K., Tuma D.J. y Sisson J.H. (2001) Malondialdehyde-acetaldehyde-adducted bovine serum albumin activates protein kinase C and stimulates interleukin-8 release in bovine bronchial epithelial cells. *Alcohol* **25**, 159-66.
- Xiao C., Zhang J., Krnjevic K. y Ye J.H. (2007) Effects of ethanol on midbrain neurons: role of opioid receptors. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 1106-13.
- Xie T., Tong L., McLane M.W., Hatzidimitriou G., Yuan J., McCann U. y Ricaurte G. (2006) Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2639-51.
- Yamamoto B.K. y Spanos L.J. (1988) The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur. J. Pharmacol.* **148**, 195-203.
- Yamamoto B.K., Nash J.F. y Gudelsky G.A. (1995) Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the

- substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 1063-70.
- Yamawaki S., Lai H. Y Horita A. (1983) Dopaminergic and serotonergic mechanisms of thermoregulation: mediation of thermaleffects of apomorphine and dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**, 383-8.
- Yang C.Y. y Lin M.T. (2002) Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia. *Stroke* **33**, 790-4.
- Yeh S.Y. (1999) N-tert-butyl-alpha-phenylnitron protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of serotonin in rats. *Synapse* **31**, 169-77.
- Yim H.J. y Gonzales R.A. (2000) Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol* **22**, 107-15.
- Yoshimoto K. y Komura S. (1989) Genetic differences in the effects of voluntary ethanol consumption on brain monoamine levels in inbred strains of mice, C57BL/6J, C3H/He and DBA/2Cr. *Alcohol* **24**, 225-9.
- Yoshimoto K., McBride W.J., Lumeng L. y Li T.K. (1992) Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. *Alcohol* **9**, 17-22.
- Yoshimoto K., Yayama K., Sorimachi Y., Tani J., Ogata M., Nishimura A., Yoshida T., Ueda S. y Komura S. (1996) Possibility of 5-HT₃ receptor involvement in alcohol dependence: a microdialysis study of nucleus accumbens dopamine and serotonin release in rats with chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**, 311-9.
- Yuan J., Cord B.J., McCann U.D., Callahan B.T. y Ricaurte G.A. (2002) Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J. Neurochem.* **80**, 960-9.
- Zaczek R., Culp S. y De Souza E.B. (1990) Intrasyntosomal sequestration of. *J. Neurochem.* **54**, 195-204.
- Zeevalk G.D. y Nicklas W.J. (1996) Hypothermia and metabolic stress: narrowing the cellular site of early neuroprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**, 332-9.
- Zharkovsky T., Kaasik A., Jaako K. y Zharkovsky A. (2003) Neurodegeneration and production of the new cells in the dentate gyrus of juvenile rat hippocampus after a single administration of ethanol. *Brain Res.* **978**, 115-23.
- Zheng Y. y Lavery R. (1998) Role of brain nitric oxide in (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res.* **795**, 257-63.
- Zimatkin S.M. (1991) Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J. Neurochem.* **56**, 1-11.
- Zimatkin S.M. y Deitrich R.A. (1995) Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **19**, 1300-6.
- Zimatkin S.M., Pronko P.S. y Grinevich V.P. (1997) Alcohol action on liver: dose dependence and morpho-biochemical correlations. *Cas. Lek. Cesk.* **136**, 598-602.
- Zimatkin S.M., Liopo A.V. y Deitrich R.A. (1998) Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 1623-7.
- Zimatkin S.M., Liopo A.V., Slychenkov V.S. y Deitrich R.A. (2001) Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol. I: Studies in outbred animals. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **25**, 976-81.
- Zimatkin S.M., Pronko S.P., Vasiliou V., Gonzalez F.J. y Deitrich R.A. (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **30**, 1500-05.
- Zuo G.C., Yang J.Y., Hao Y., Dong Y.X. y Wu C.F. (2007) Ethanol and acetaldehyde induce similar changes in extracellular levels of glutamate, taurine and GABA in rat anterior cingulate cortex. *Toxicol. Lett.* **169**, 253-8.